(19) 日本日本日本111 (1 P)

(12) 公開特許公報(4)

特開2001-352986 (11)特許出版公园春号

(P2001-352986A)

(43)公開日 平成13年12月25日(2001.12.25)

P 1 F-72-1 (##)	A01H 5/00 A 2B030	A01K 67/027 2G045	67/033 501 48024	A 6 1 K 39/395 D 4 B 0 6 3	N 4B064	警査請求 未請求 開京項の数56 OL (全 52 頁) 最終頁に殺く	(71) 出版人 000001029	協和跟摩工業株式会社	東京都千代田区大平町1丁月6番1号	(72)発明者 小畑 長英	東京都町田市加町3丁目6番6号 協和職	静工操株式会社東京研究所内	(72)発明者 図 遠也	東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協	和威胁工業株式会社本社内	(72)発明者 太田 紀夫	東京都町田市旭町3丁目6時6年 転泊職	野工業株式会社東京研究所內	> 類が回 独成
1000年	ZNA			501		等性的	♦ (175475)		平成12年6月12日(2000.6.12)										
(51)Int.Cl.	C12N 15/09	A01H 5/00	A 0 1 K 67/027	67/033	A 6 1 K 38/00		(21)出版縣等		(22) // (EE)										

(54) [免別の名称] 制造ポリヘプチド

ンチセンスDNA/RNA、酸DNAを用いた遺伝子治 後、数ポコペンチドを記載する抗体、数ポコペンチドの ド、蚊ボリペプチドをコードするDNA、鮫DNAのア 陌性上昇改変体、 散ポリペプチドのドミナントネガティ 【原題】NF-×Bの活性化が関与する疾患の治療薬、 予防薬 および診断薬の被叛、開発に女用な ポリペプチ ブ度質体、およびこれらの利用法を提供する。

【解決手段】NF-xBを活性化するボリペプチドを両 原し、数ポリペプチドをコードするDNA、および数ポ リペプチドを記載する抗体を製造する。これらはNFー k Bの陌性化が関与する疣歯の治療薬の探察ならびに診 断に利用することができる。

【柳求項1】 配列番号1~5のいずれかで喪されるア ミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有す

るポリペンチド

ミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列におい て1以上のアミノ睦が欠失、団換および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつNF-×Bの活性を上 【柳求項2】 配列番号1~5のいずれかで喪されるア 昇させる活性を有するポリペプチド。

アミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列と6 0%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつN 【糖求項3】 配列番号1~5のいずれかで喪される Fーx Bの活性を上昇させる活性を有するポリペプチ 【顔求項4】 顔求項1~3のいずれか1項に配戴のボ リペプチドをコードするDNA。

【精求項5】 配列番号6~10のいずれかで喪される 協島配列を有するDNA。

リンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであ 【簡求項6】 簡求項4または5に配載のDNAとスト り、かつ転写因子NF一×Bの活性を上昇させる活性を **有するポリペプチドをコードするDNA。**

8

【酢水項7】 糖水項4~6のいずれか1項に配載のD NAをベクターに組み込んで得られる組換え体ベクタ 【顔状斑8】 顔状斑4~6のいずれか1項に記載のD N A と相同な配列からなる R N A をベクターに組み込ん

【簡求項9】 RNAが1本銭である間求項8配帳の組 【請求項10】 請求項7記載の組換え体ベクターを保 で得られる阻換え体ベクター。 数え存べクター。

【稿次項11】 形質院校体が、領生物、動物細胞、結 物細胞、および昆虫細胞からなる群より遺ばれる形質転 校体である、龍水屋10配敷の形質転換体。 有する形質転換体。

【精求項12】 微生物が、Escherichia属に属する微 【柳来項13】 動物細胞が、マウス・ミエローマ細 生物である、請求項11配載の形質転換体。

細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎 **- 1 節間、 Nト胎児配質値間およびNトロ自体値間かの 間、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ** 職組造、Namaiwa組造、Namaiwa KJM 遺ばれる動物細胞である、鯖沢項11配載の形質転換

【諸次項:4】 昆虫細胞が、<u>Spodoptera frugiperda</u> の卵巣細胞、<u>Trichoplusia ni</u>の卵巣細胞およびカイコ の卵巣細胞から遺ばれる昆虫細胞である、間水項:1配

ック動物またはトランスジェニック植物である、精沢項 【精状項15】 形質を数体が、非ヒトトランスジェニ

8

特開2001-352986

3

10部裁の形質散数符。

【鶴水頂16】 鶴水頂10~14のいずれか1風に記 数の形質転換体を倍地に倍差し、培養物中に間収収1~ せ、 該培養物から酸ポリペプチドを採取することを特徴 3のいずれか!項に配載のポリペプチドを生成、整備さ とする、骸ポリペプチドの製造方法。 [請求項17] 請求項7配載の組換え体DNAを保存 する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、糖状項1 ~3 のいずれか1 項に配載のポリペプチドを鼓動物中に 生成、蓄積させ、眩動物中より眩ボリペプチドを採取す ることを特徴とする、核ポリペプチドの製造方法。

【ி数文項18】 蓄積が動物のミルク中であることを特 【柳東項19】 - 精東項7配配の組換え体DNAを保有 散とする、顔水項17配載の製造法。

するトランスジェニック植物を栽培し、糖求項1~3の 替債させ、敵植物中より骸ポリペプチドを採取すること いずれか!項に記載のポリベプチドを取植物中に生成、 を特徴とする、骸ポリペプチドの製造法。

【創水項20】 創水項4~6のいずれか1項に配配の DNAを用い、in vitroでの転写・翻訳系により、数D NAのコードするポリペプチドを合成することを特徴と する、数ポリペプチドの製造法。

【樹状瑛21】 鶴状瑛1~3のいずれか1項に配載の 【格女母22】 糖女母4~6のいずれか!単に記載の ポリペプチドを認識する抗体。

DNAの塩基配列中の連続した5~60塩基からなる配 列を有するオリゴヌクレオチドまたは眩ヌクレオチドと 相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド。

【柳求項23】 燗求項4~6のいずれか1項に配載の ローブとして用いてハイブリダイゼーションを行うこと DNAまたは間求項22配載のオリゴヌクレオチドをプ を合む、趙宋項1~3のいずれか1項に配戴のポリペプ

【格求項24】 精求項22配載のオリゴヌクレオチド をプライマーとして用いたポリメラーゼ・チュイン・リ アクションを行うことを含む、簡求項1~3のいずれか 1項に配戴のポリペプチドをコードするDNAの発現を チドをコードするDNAの発現を検出する方法。

【間求項25】 顔求項4~6のいずれか1項に記載の DNAまたは簡求項22記載のオリゴヌクレオチドを用 い、ハイブリダイゼーション法により、信状項 1~3の いずれか!項に記載のポリペプチドをコードするDNA 検出する方法。

【梢状斑26】 駒状斑22配戦のオリゴヌクレオチド を用いたポリメラーゼ・チェイン・リアクションを行う ことを含む、請求項1~3のいずれか1項に配載のポリ ペプチドをコードするDNAの登<mark></mark>程を検出する方法。 の変異を検出する方法。

【精求項27】 感染や炎症を伴う疾患、異常な平清筋 組飾の分化増殖を伴う疾患、異常な複雑芽細胞の活性化 を伴う疾患、異常な滑眼組織の活性化を伴う疾患、腮盤

BEST AVAILABLE COPY

€

特開2001-352986

8年間の阿吉を伴う成団、異常な戦争細胞の活性化を伴 5 戌団、昭常な免疫価値の活性化を伴う疾患、または異 常な細胞増殖を伴う疾患を検出するために用いる、請求 項23~26のいずれか1項に配載の方法。

第、HIV原乳、便性3型肝炎に代数される活動性便性 肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各 【静水項28】 感染や炎症を伴う疾患が、微生物感 種脳脊髄炎、もし自性心下金、エンドトキシンショッ

南、外傷性脳損傷または炎症性間疾患であり、異常な平 ク、敗血症、移植片対償主疾患、インスリン依存性糖尿 滑筋細胞の分化増強を伴う皮度が動脈硬化または再狭物 であり、賢常な糠糠芽細胞の活性化を伴う疾患が肺糠維 位であり、腎常な清難組織の活性化を伴う疾患がリウマ **子性関節炎または低形性関節炎であり、膵臓が細胞の障** 曹を伴う鉄即が鶴泉崩であり、昭常な破骨間間の語性化 を伴う疾患が骨粗骼虚であり、異常な免疫細胞の活性化 を伴う供担がアレルギー、アトピー、軸思、花粉症、気 問過軟または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴 う疾患が急性骨腫性白血病または脚性腫瘍である、精炎

【樹沢頃29】 顔坎珥4~6のいずれか1項に配戴の DNAまたは糖水項22配載のオリゴヌクレオチドを用 いるにとかな気にする、信状版1~3のいずにか1度に 配敷のポリペプチドをコードするDNAの転写またはm RNAの翻訳を哲問する方法。

項27記載の方法。

【樹沢頃30】 間沢頃4~6のいずれか1項に配数の いることを特徴とする、動火項1~3のいずれか1項に DNAまたは前求項22配配のオリゴヌクレオチドを用 記憶のポンペプチドをコードする DNAのプロセーター 【請求項31】 請求項1~3のいずれか1項に配載の 領域および転写制御領域を取得する方法。

[**開**採項32] 開来頃4~6のいずれか!現に配載の DNA、または農火項8若しくは9のいずれか1項に配 **ポリスプチドが仰む困難。**

【精水項33】 制氷項21配載の抗体を含む医薬。 気の指数大体ベクケーが包む取職。

額収填22記載のオリゴヌクレポチド を合む図表

ポリペプチドが免疫域活作用を有する ことを特徴とする請求項31 記載の困薬。 【胡米和35】

び抗ウイルス活性を誘導することを特徴とする請求項3 【柳沢頃36】 免疫既治作用を介して抗腫瘍活性およ 5 記載の困難。 四瀬が、原味や炎症を伴う疾患、異常 の活性化を伴う疾患、異常な過難組織の活性化を伴う疾 一部間の相談のは他を伴う状態、異常な数を相談の治 な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な酸粧芽細胞 異常な細胞性強を伴う疾患または神経細胞の障害にあづ く成態の治療はよび/または予防のための困寒である、 住化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、 【44米項37】

単説細胞の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性 な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な複雑芽細胞 の活性化を伴う疾患、異常な滑髄組織の活性化を伴う疾 化を伴う疾用、異常な免疫細胞の活性化を伴う残倒、ま たは異常な細胞増殖を伴う疾患の診断のための医薬であ 【創水項38】 医薬が、感染や炎症を伴う疾患、関補 る、酢水項32~34のいずれか1項に配截の医薬。 樹沢頃32~34のいずれか1項に配敷の困薬。

【柳末項39】 感染や炎症を伴う疾患が、微生物感

築、HIV感染、慢性B型肝炎に代表される活動性便性 肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各 **肩、外傷性脳損傷または炎症性脚疾患であり、異常な平** ク、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性糖尿 であり、異常な複雑芽細胞の活性化を伴う疾患が肺線維 暫を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化 滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭物 症であり、異常な滑頭組織の活性化を伴う疾患がりウマ 千柱陽節炎または疫形性陽節炎であり、膵臓り細胞の障 を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化 を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉虚、気 道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴 う疾患が急性骨髄性白血病または悪性腫瘍であり、神経 **細胞の関節に基づく疾患がアルツにイマー検束たは最血** 種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンショッ 性脳疾患である、加水項37または38配載の医薬。

【精状項40】 開状項1~3のいずれか1項に配める 伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異 ポリペプチドを用いることを特徴とする、感染や炎症を 常な複雑芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑機組織の 活性化を伴う疾患、膵臓β細胞障害を伴う疾患、異常な 破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化 を伴う疾患、異常な細胞増殖を伴う疾患または神経細胞 の障害に基づく疾患の治療および/または予防のための 医薬のスクリーニング方法。

Ry、H I V 感染、便性 B 型肝炎に代表される活動性便性 肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各 【朝求頃41】 恩保や炎症を伴う疾患が、微生物感 種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンショッ

ク、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性糖尿 府、外傷性脳損傷または炎症性闘疾患であり、異常な平 滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭管 であり、異常な微維芽細胞の活性化を伴う疾患が肺凝維 虚であり、異常な滑躁組織の活性化を伴う疾患がリウマ **子性関節炎または変形性関節炎であり、膵臓β細胞の**障 音を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化 を伴う疣患が骨粗軽症であり、異常な免疫細胞の活性化 を伴う疾患がアフルギー、アトピー、喘息、花粉症、気 道過数または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴 う疾患が急性骨髄性白血肉または悪性腫瘍であり、神経 **哲哲の墓却に越力へ 新断が アラッて イヤー 依果 たら 観句**

性脳疾患である、請求項40記載の医薬のスクリーニン

ニング方法により得られる、請求項1~3のいずれか1 **【樹吹項42】 - 創求項40または41配配のスクリー** 頃に記載のポリペプチドに特異的に作用する医薬。

ードする DNAのプロモーター領域および転写制御領域 を用いることを特徴とする、感染や炎症を伴う疾患、異 常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な裸維芽細 【樹坎頃43】 精求項30配戦の方法により得られる 橋安良1~3のいずれか1項に配敷のボリペプチドをコ 疾患、膵臓β細胞障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活 異常な細胞増殖を伴う疾患または神経細胞の障害に基づ **飽の活性化を伴う疾患、異常な滑躁組織の活性化を伴う** く疾患の治療および/または予防のための医薬のスクリ 性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、

兇、HⅠV感染、慢性B型肝炎に代表される活動性慢性 肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各 **配架や炎症を伴う疾患が、微生物感** 種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンショッ 【制灰項44】

ク、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性糖尿 病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常な平 滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭窄 道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴 であり、異常な複雑芽細胞の活性化を伴う疼患が肺線維 症であり、異常な滑脚組織の活性化を伴う疾患がリウマ チ性関節炎または変形性関節炎であり、膵臓β細胞の障 善を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化 を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化 う疾患が急性骨髄性白血病または駆性腫瘍であり、神経 **哲問の厚着に 魅力へ 仮倒がア ルツハイマー 仮または 協**血 性脳疾患である、請求項43配載の医素のスクリーニン を伴う疾患がアフルギー、アトピー、幅息、花粉症、

ニング方法により得られる、請求項1~3のいずれか1 特徴とする、創水項1~3のいずれか1項に記載のボリ 【精求項45】 請求項43または44配載のスクリー 【趙宋頃46】 精求項21配載の抗体を用いることを 項に記載のポリペプチドをコードするDNAのプロモー ター領域および転写制御領域に特異的に作用する困義。 **んプチドの免疫学的被出布。**

【桷求項47】 精求項21記載の抗体を用いて、精求 項1~3のいずれか1項行記載のポリペプチドを被出す ることを特徴とする免疫組織染色法。 特徴とする、精求項1~3のいずれか1項に配載のポリ ペプチドをコードする DNA の転耳もしくは翻訳を抑制 または促進する物質をスクリーニングする方法。

ポリペプチドをコードするDNAの発現が一部または完 【簡求項49】 請求項1~3のいずれか1項に配配の

ŝ

全に抑制されているノックアウト非ヒト動物。

ポリペプチドの有する活性が一部または完全に抑制され [韓米県50] 韓米県1~3のいずれか1項に記載の ているノックアウト非ヒト動物。

【糖求項51】 糖求項1~3のいずれか1項に配載の のいずれか」頃に記載のポリペプチドのNF-FB泊件 化に対してドミナントネガティブ活性を有する変異体ポ ポリペプチドを用いることを特徴とする、請求項1~3 りペプチドのスクリーニング方法。

【桷水項52】 柳水項51配敷のスクリーニング方法 により得られる、糖状項1~3のいずれか1項に配載の ポリペプチドのNFーx B活性化に対してドミナントネ ガティブ活性を有する変異体ポリペプチド。 【循状項53】 糖状項52配敷の数異体ポリペプチド 【僧状項54】 婚状項1~3のいずれか1項に配配の ETHIT SONA.

のいずれか!項に記載のポリペプチドのNF-×B浜性 ポリペプチドを用いることを特徴とする、糖求量 | ~3 化に対して該活性化を上昇させる変異を有する変異体ポ しんプチドのスクリーリングが符。

【樹求項55】 - 創求項54配載のスクリーニング方法 のポリペプチドのNF-*B洛性化能が上昇した変製体 により取得される、間求項1~3のいずれか1項に記載

【静求項56】 - 創氷項55配載の変異体ポリペプチド ポリヘンチド

ED-FTSDNA. 【発明の詳細な説明】

[0000]

ド、核ポリペプチドをコードするDNA、核DNAをペ 体DNAを保有する形質転換体、鼓形質転換体を利用し た鮫ポリペプチドの製造法、鮫DNAより得られるオリ ゴヌクレオチドを用いた該DNAの発現量と変異の解析 法、眩ボリペプチドを認識する抗体、眩抗体を用いた免 佐組織発色法、核ポリペプチドに欠失・挿入・配換等に より変異を導入した活性上昇改変体、骸ポリペプチドに ガティブ変異体、眩ボリペプチドの活性を変動させる化 [発明の属する技術分野] 本発明は、新規なポリペプチ クターに組み込んで得られる組換え体DNA、酸組換え 欠失・樺人・団換等により変異を導入したドミナントネ 合物のスクリーニング法、眩DNAの発現を変動させる 化合物のスクリーニング法、 岐DNAの転写を引るプロ モーターDNA、核プロモーターDNAによる転耳の効 **率を変動させる化合物のスクリーニング法、これちのス** クリーニング法により得られる化合物、および核DNA を欠損または変異させたノックアウト動物等に関する。

軽鏡 (Ig Hight chaln) 遺伝子の発現にかかわるエンハ v B)は、1986年にB相間における免疫グロブリン 【従来の技術】nuclear factor-kappaB(以下、NFー ンサーに結合する転び因子として同定された(Gell. 4

時間2001-352986

間間で一般に誘導されてくるNFーxBは、p50とR 【0003】NF-×Bは、Re1ファミリーに属する 複数の分子のヘテロダイマーで構成されており、多くの c I Aのヘテロダイマーと考えられる(No.1. Cell. Blo | *Bの存在も明らかとなっており、1 kBは、無刺激 時にはNF-*Bと複合体を形成しており、NF-*B の抜移行シグナルをマスクすることにより、抜移行を抑 剛している (Science, <u>242</u>, 540-546 (1988), Cell. <u>6</u> <u>5</u>, 1281-1289 (1991), Cell. <u>68</u>, 1109-1120 (1992), E MBO J., <u>12</u>,3893-3901 (1993), Cell, <u>78</u>, 773-785 (19 94), Cell, <u>87</u>, 13-20 (1996)]。 **頭海**糖形因子 (以 .. 12, 674-684 (1992))。 NFーκBを制御する因子 ド、TNFーa)等で個階を刺激すると、I x Bは後述 するシグナル伝達分子により32ねよび36番目のセリ **僚々な遺伝子発現を誘導するようになる(Cell, <u>80</u>、529** ンがリン酸化、低いたユピキチン化され、 プロテアンー * Bは核への移行が可能となり、エンハンサーを持った 【0004】NF-xBを活性化する物質あるいは刺激 ムによって分解される。1×Bが分解されると、NFー .532 (1995), Cell. 80. 57 3-582 (1995)) .

8)、インターロイキン2 (以下、11-2)、白血体 阻止因子 (以下、11F)等)、T部間マイトジェン フォア)、B価値マイトジェン(抗!BM抗体、antI-CD40)、ロイコトジェン、リボ多種(以下、L イルス(以下、HIV-I)、ヒトT価配白血伝ウイル (抗原制徴、フケチン、抗T価配フセプター抗体、抗C P S) 、ホルボールミリステートアセテート (以下、P MA)、寄生体感染、ウイルス感染(ヒト免疫不全症ウ x、HBX、EBNA-2、LMP-1等)、DNA缺 EBV)、サイトメガロウイルス(以下、CMV)、単 **感へどくスケイドスⅠ(以下、HSV-1)、ヒャヘジ** ペスウイルス6 (以下、HHV-6) 、ニューカッスル ロヘキシミド)、蝦外線、放射線、酸化ストレス等が知 られている (Blochemica et Blophysica Acta, 1072, 6 | Lー1 a)、インターロイキン | β (以下、1 Lー | D2杭体、抗CD3抗体、抗CD28抗体、CBイオノ ぼウイルス (以下、NDV) 、センダイウイルス、アデ 華物質質、ダンパク質合成インヒビター類(例えばシク 3-80 (1991), Annu. Rev. Cell Blol. 10, 405-455 (19 として、サイトカイン(TNF-a、随係境死因子ゟ (以下、TNF-B) 、インターロイキン1a(以下、 ノウィルス等)、ウイルス盛物(二本線RNA、Ta ス!(以下、HTLV-I)、B型肝炎ウイルス(以 F、HBV)、エプスタインーパールウイルス(以下、

| 0.0.5 | また、NFー×Bの活住により時時程度 される分子としては、(1)対位反応・免疫は皆に関る 分子師、(2) アポトーシスの四部に関る分子群、

(3) 発生・分化に関る分子群、(4) ウイルスに関す

る分子群等が知られており(Biochemica et Biophymica Acta, <u>1072</u>, 63-80 (199 1)、Annu. Rev. Cell Biol. 1<u>0</u>, 405-455 (1994))、誘導発現は多域にわたってい

ンターロイキン3(以下、11~3)、インターロイキン6(以下、11~6)、インターロイキン8(以下、11~6)、インターロイキン8(以下、11~8)、インターロイキン12(以下、11~1 2)、TNF-a、TNF-β、インターフェロン B (以下、IFN-β))、細胞増殖因子(マクロファー ジコロニー創製因子(以下、M-CSF)、要粒球マク 数粒味コロパー創練因子(以下、GICSF))、 フセ プター (インターロイキン・レセプター (以下、11~ a(以下、iL-2Ra)、免疫グロブリン (転銭) (以 適合抗原 (以下、MHC) クラス1, 11、β2ーミク ログロブリン)、接種因子 [endothelial leucocyte ad ll adhesion molecule-I(以下、VCAN-I)、intercellula 語かンパケ質(日雀アミロイドA 与配タンパク質、アン ギオテンシノーゲン、補体因子B、補体因子C3、補体 因子C4)、誘導型NO合成酵素(以下、INOS)、 18) アンタゴニスト、インターロイキン2 レセプター F、IgーェーLC)、T価間レセプターA、主要組織 hestonmotecule-1(以下,ELAM-1), vascular ce 皮細胞成長因子受容体(以下、VEGF-R2)、転奪 インターレュロン関節因子(以下、1RF-1))、ピ ザル免疫不全症ウイルス(以下、SIVmac)、CM 40)、アデノウイルス)等が知られている(蛋白質核 ロファージコロニー色製因子(以下、GM-CSF)、 r adhesion molecule-1(以下、I C A M-1)]、急性 シシロギキシゲナーゼ2 (以下、COXー2)、 自動板 メンチン、ウイルス(HIV-1、HIV-2、アカゲ V、HSV-1、アカゲザルウイルス40(以下、SV 【0006】虧導発現される分子として、具体的には、 因子 (c-Rel, pl05, lκーα, c-Myc, #41542 (11-1a, 11-1B, 11-2, **肢群集, 41, 1198-1209 (1996)]。**

7), Science, <u>278</u>, 860-866 (1 997), Science, <u>278</u>, 8 66-869 (1997), Cell, <u>91</u>, 243-252 (1997), Mature, <u>3</u> <u>95</u>, 292-296 (1998)) •

(0008] IL-Iからの落性化シグナルにおいては、IL-I receptor 1 (以下、IL-I R J、IL-I R A C P)、Myd 8、IL-I receptor accessory protein (以下、IL-I R A C P)、Myd 8 8、IL-I receptor-associated kinase (以下、I R A K) Thr receptor-associated factor 6 (以下、T R A F 6)、TAKI binding protein 1 (以下、T A B I)、Transforaling growth factor-β-activated kinase I(T A K I)等が活性化分子として現出されている(Sectence、<u>220</u>、2008-2011 (1995)、Nature、388、252-28 (1999))。

「 0009] 一方、NFー×Bをリン酸化する酵素 (N・Fー×Bキナーゼ) がNFー×Bシケナルの地強に関わっているともまられてまた (J. Blo」 Chem 208、26 790-28795 (1993) EM90 J. 13, 4597-4607 (1994)。 以上のように、NFー×Bの活性化には非常に多くの分子が関与ていることは知られているが、同定された事が関与していることは知られているが、同定された。 4分類の上でいるとの行ではない。 44分類 さんトン等のTNFー aや ILー I 以外の刺激では、NFー×Bの活性化に関わる分子は、ほとんど解明されていないのが実状である。さらに、Re Iファミリー分子の組織制の形式を見ても、組織料関的なNF・R Bの活性化関が予想される(Sclence、204、313-31 (1999)、Sclence、204、310-320 (1999)。

【0010】以上より、NFー×Bの活性化に関わっている未知の分子は、生体内に実だ多く存在すると考えら M、C、たちの遺伝子を発見し利用することは、前窓の解明あるいはNFー×Bが関与する疾患の治療にとって、大変有用である。前述したNFー×Bが活性化する分子・再からもわかるように、NFー×Bは生体内の免疫が等からはボウィルス活性を有するTNFー。や1Lー1等のサイトカインは、その作用の主要部分をNFー×Bの開催化を通して発揮している。抗震痛あるいは抗ウィルス活性を有するTNFー。や1Lー1等のサイトカインは、その作用の主要部分をNFー×Bの開催性を通して発揮している。また、NFー×Bによりち襲撃観覚る1Lー1、1Lー2、1Lー12、TaNF・Aはおける免疫反応を高値し、抗理路あるいは抗ウィルス

【0011】このように、実際の疾患においてNF-×Bの活性にが、腫瘍やウイルスを抑制することは廃却の事故であり、生体内あるいは生体の一部組織においてNFF・Bの活性を人為的に上昇させることは、免疫応等の馬ůあるいは抗腫瘍・抗ウイルス活性の増強において非常に効果があると考えられる。従って、NF-×Bを活性化するポリペプチドおよびそれをコードするDNA

重要な創業おるいは治療ターゲットである。

の発見および取傷、さらにはNFーκB倍性化上界変質 体の発見および取得は、抗腫癌・抗ウイルスをターゲットとした医薬において大変有用である。

[0012] 一方で、NFー×Bによって誘導発現する 1 L-1、1 L-6、1 L-8、TNF- a 等のサイト カインは、女の性性にあるされの現代。これらのサイト カインは、女の性にあるされる母の様のものサイトカインは、マ カの原因となっている。これらのサイトカインは、マ カロアファージ、好中球、リンパ母等を活性に、 核位目 橋において地部の方向に膨く。また、NFー×Bにより 観導されたELAM-1、VCAM-1、ICAM-1 等の接着分子は、白血球の組織への表面を促進し、 技能 組織での白血球の集積を再進する (Not. Cell. Blol... 14、5701(1994)、Not. Cell. Blol... 14、5520(1994)、Not. Cell. Blol... 14、520(1994)、Not. Cell. Blol... 14、5220(1994)、Pro. Not. Acad. Sci USA、go. 3943(199)。 1)、Pro. Not. Acad. Sci USA、go. 3943(199)。 1)、Pro. Mot. Acad. Sci USA、go. 3943(199) (Cegg (UFT、NO) やプロスタランディンE2を発 住し、急性状態や血管の拡張に作用する。

【0013】すなわち、NFー×Bは、これらの細胞あるいは分子を介して、急性核底および慢性核能において即心的投刺を付していると考えられる。 契辱に、慢性間かりマチの冷削、クローン前の間音、地見の時組織等では、NFー×Bの活性化が報告されている。したがって、アレルギー、アトピー、軸記、(花形能、残滅過敏、自己免疫疾患、慢性B型肝炎、慢性C型肝炎、移植片対間主疾患、インスリン依存性・非依存性健疾病、外傷性筋腫病、メンスリン依存性・非依存性健疾病、外傷性筋腫病、メンスリン依存性・非体が疾病等、炎症が関係が発生を限において、NFー×Bは、病胞類明および治療薬防乳の裏数なシーゲットである。

【0014】 摘との阿瀬では、パーキットリンパ類(Bu NK細胞リンパ瞳、EBV間達胃癌等が、EBVが原因 とされる。特にEBVがコードするlatent membrane pr 箱合が可能で、樹主のNFー×Bを活性化し、不死化に (1998)] 。また、成人工細胞白血病 (adult T-cell leu kemia: ATL) は、HTLV-Iによる感染が原因で あり、特にHTLV-IがコードするTaxが、IxB を活性化し、アポトーシスを阻断していると考えられる **得等する各種接着分子は、癌細胞の転移に関与している** し、NFーxBによるアポトーシス阻害活性やVECF -R2を介した血質新生は、癌細胞の増殖に関与してい る。以上のように、NFー×Bは、箱の分野においても (1997), J. Virology, 69, 2168-2174 (1995), Oncagen への結合あるいはIKKの活性化を通じて、NF-xB otein (以下, LMP 1) は、TRADDやTRAFと e. 18. 7161-7167 (1999), Gene Th erapy, 5,905-912 U. Biol. Chem., 273, 15891-15894 (1999), J. Blo 陽与していると考えられる (EMBO J., 1<u>6</u>, 6478-6485 274, 34417-34424 (1999)) . NF-xBb rkitt lymphoma)、ホジキン (Hodgkin) 病、T, B,

【0015】さらに、エイズ等、歯以外のNFー×Bを 報告があり、動脈硬化、再狭窄等も含め、平滑筋細胞の G耳因子として含むウイルス性疾患においても、NFー 代による語物楽説、アポトーシスの哲学等が原因という た、最自性脳疾患等の最后再過筋障害もNF-×B活性 職権な分化増殖を伴う疾患の発症にNF-x Bが重要な × Bは鼠型な創業あるいは治療ターゲットである。ま 役割を果たしているとなえられる。

(1995), Scelence, <u>270</u>, 286-290 (1995), Nolecular an 【0016】近年ステロイドの杭炎症作用やアスピリン の抗災症作用等がNFーxBの阻害によるものであるこ て知られてきた義剤は副作用が強いことや選択性・特異 - x Bを活住化する新規ポリペプチドは産業上有用であ d Cellular Biology, 15, 943-953 (1995)) , NF- x Bを特闘的に阻害するものとしてスクリーニングされた 類別はない。既存のNFー×Bの阻害に関わるものとし 性が低い等、問題点も多く、強力かつ即作用の少ない新 しい抗災症薬の開発を目的として、NFー×Bをターゲ ットにした化合物探索が行われている。以上より、NF り、これらポリペプチドおよびそれをコードするDNA とが明らかにされてきたが (Sceience, 270, 283-286

炎、うっ血性心下金、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の 思、移植片対荷主成暦等の異常な免疫細胞の活性化を伴 非依存性确原病、糸球体胃炎、乾癬、痛風、各種脳脊髓 **原染や技症を伴う疾患、パーキットリンパ腫、ホジキン** 体、各種リンパ腫、成人工細胞白血液、斑粒腫瘍等の質 常な細胞増殖を伴う疾患、陽節リウマチ、魔形性関節炎 韓哲に 魅力へ疾患、 アルツハイマー病、 パーキソンソ病 中の神経価値の音響に越力へ疾患、悪院原行・再味会等 金、金子性故症反応症候群(SIRS∶systemic infla エイズ等のウイルス性疾患、虚血性脳疾患の神経細胞の 慢性B型肝炎、慢性C型肝炎、インスリン依存性 【発明が解決しようとする課題】本発明は、アレルギ 一、アトビー、唱恩、花粉症、気道過敏、自己免疫疾 **も校想、エンドトキシンショック、改由信、簡生物略** 等の異常な物理が細胞や清悶組織の活性化を伴う疾患、 の平滑筋粗粗の異常な分化増殖を伴う疾患、多臓器下 mentory response syndrome)、 成人呼吸的迫症候群 sí.

等の治療薬、予防薬および診断薬の探索、開発に有用な ポンヘプチド、数ポンヘプチドをコードするDNA、数 DNAのアンチセンスDNA/RNA、鮫DNAを用い た遺伝子治療、肢ポリペプチドを認識する抗体、核ポリ ヘプチドの箔在上昇投資(4、販ポリヘプチドのドミナン トネガティブ産乳体、およびこれらの利用法を提供する (ARDS adult respiratory distress syndrome)

を解決するべく鋭意検討を行った結果、新規なアミノ酸 をコードするDNAを取得することに成功し、本発明を 配列を含むNF-xBの活性化を促す因子ねよび酸因子 究成させるに至った。即ち、本発明は以下の(1)~

【0019】(1) 配列番号1~5のいずれかで扱さ れるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列 をなするポリペプチド。

(54)に関する。

(2) 配列番号1~5のいずれかで殺されるアミノ酸 配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列において!以 ミノ酸配列からなり、かつNFー×Bの活性を上昇させ 上のアミノ酔が欠失、関換および/または付加されたア る活性を有するポリペプチド。

トるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列 と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、か 【0020】 (3) 配列番号1~5のいずれかで扱き ONFーĸ Bの活性を上昇させる活性を有するポリペプ

(1) ~ (3) のいずれか一般に配義のよっく プチドをコードするDNA。 €

(5) 配列番号6~10のいずれかで投される協島配 列を有するDNA.

> の取得が求められてきた。 [0017]

(4) または (5) に配載のDN Aとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするD (0021) (6)

NAであり、かつ転写因子NFー×Bの活性を上昇させ (4) ~ (6) のいずれか!項に配載のDNA る活性を有するポリペプチドをコードするDNA。 3

(4) ~ (6) のいずれか1項に配載のDNA **たくクターに組み込んで得られる組換え体ベクター。** (8)

と相同な配列からなるRNAをベクターに組み込んで得 られる組換え体ベクター。

【0022】(9) RNAが1本鎖である(8)配載 の題換え体ベクター。

(10) (1)記載の超換え体ベクターを保有する形 西后校体。

抱、および昆虫細胞からなる群より選ばれる形質転換体 (11) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細 である、(10)配数の形質配換体。

(12) 微生物が、Escherichia間に属する微生物で ある、(11)記載の形置院校拝。

一マ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザ 【0023】(13) 動物細胞が、マウス・ミエロー マ質粒、ラット・ミエローマ価粒、マウス・ハイブリド IMーI組む、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血疾細胞 から選ばれる動物細胞である、(11)配敷の形質転換 ル質質細胞、Namalwa細胞、Namalwa K

細胞から選ばれる昆虫細胞である、(11)配配の形質 (14) 昆虫細胞が、Spodoptera frugiperdaの卵巣 価間、<u>Trichoplusia ni</u>の卵巣価胞およびカイコの卵巣

8

【課題を解決するための手段】本籍明备らは、上記課題

のポリペプチドをコードする DNAの変異を検出する方

(21) 感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の 疾患、異常な清膜組織の活性化を伴う疾患、膵臓β細胞 **観、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、または異常な** 分化増殖を伴う疾患、異常な複雑芽細胞の活性化を伴う 細胞増殖を伴う疾患を検出するために用いる、 (23) の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾 ~ (26) のいずれか1項に配配の方法。

物感染、HIV感染、慢性B型肝炎に代表される活動性 【0030】(28) 弱染や炎症を伴う疾患が、微生 風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンツ ョック、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性 な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再 狭窄であり、異常な複雑芽細胞の活性化を伴う疾患が肺 標準症であり、異常な滑頭組織の活性化を伴う変更がり ウマチ性関節炎または変形性関節炎であり、膵臓角細胞 の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活 住化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活 糖尿病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常 **症、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増** 俊性肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾節、痛 性化を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉 殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または駆性腫瘍であ

る、(27)記載の方法。 【0031】(29) (4)~(6)のいずれか1項 ドを用いることを特徴とする、(1)~(3)のいずれ に記載のDNAまたは (2.2) 記載のオリゴヌクレオチ か1項に配載のポリペプチドをコードするDNAの転写 またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

(30) (4)~(6)のいずれか1項に配配のDN とを特徴とする、($oldsymbol{1}$)~($oldsymbol{3}$)のいずれか1項に配載 のポリペプチドをコードする DNAのプロモーター領域 A または(2 2)記載のオリゴヌクレオチドを用いるこ および転写制御領域を取得する方法。

[0032] (31) (1) ~ (3) 0 \(\sigma\) fig. 1. に記載のポリペプチドを合む、田瀬。

(4) ~ (6) のいずれか!明に配配のDN A、または (8) 若しくは (9) のいずれか1 項に配載 の組換え体ベクターを含む医薬。 (35)

(22) 記載のオリゴヌクレオチドを合む版 (21) 記載の抗体を含む困薬。 (33) (34)

ポリペプチドが免疫賦活作用を (0033) (35)

免疫賦活作用を介して抗腫瘍活性および抗ウ 有することを特徴とする(31)配載の医薬。

(31) 医薬が、感染や炎症を伴う疾患、異常な平舟 筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な線維芽細胞の活性

形質気数体が、非ヒトトランス ジェニック動物またはトランスジェニック植物である、 (10) 記載の形質系数4。 [0024] (15)

(10) ~ (14) のいずれか1項に配載の **せ,数倍量物から数ポリペプチドを採取することを特徴** 形質危談体を倍地に培養し、培養物中に(1)~(3) のいずれか1項に配載のポリペプチドを生成、雑値さ トする、数ポリペプチドの製造力法。 【0025】(17) (7)配載の組換え体DNAを (1) ~ (3) のいずれか1項に記載のポリペプチドを 眩動物中に生成、蓄積させ、眩動物中より骸ポリペプチ ドを採取することを特徴とする、眩ボリペプチドの製造 保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、

9

(18) 蓄積が動物のミルク中であることを特徴とす る、(17)配載の製造法。 【0026】(19) (7)配配の組換大体DNAを 保有するトランスジェニック植物を栽培し、(1)~

(3) のいずれか1項に配載のポリペプチドを該植物中 に生成、蓄積させ、駁植物中より魃ポリペプチドを採取 することを特徴とする、骸ポリペプチドの製造法。

(20) (4)~(6)のいずれか1項に配載のDN Aを用い、in <u>vitro</u>での転写・翻訳系により、眩DNA のコードするポリペプチドを合成することを特徴とす め、敷がしんプチドの戦消积。 【0027】(21) (1)~(3)のいずれか1項 に配戴のポリペプチドを認戴する抗体。

Aの塩基配列中の連続した5~60塩基からなる配列を 有するオリゴヌクレオチドまたは骸ヌクレオチドと相補 (22) (4)~(6)のいずれか1項に配載のDN (23) (4)~(6)のいずれか!項に配載のDN 的な配別を有するオリゴヌクレオチド。

む、(1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチ A または(2 2)配載のオリゴヌクレオチドをプローブ 【0028】(24) (22) 記載のオリゴヌクレオ として用いてハイブリダイゼーションを行うことを含 ドをコードするDNAの発現を検出する方法。

・リアクションを行うことを含む、 $(1) \sim (3)$ のい **チドをプライマーとして用いたポリメラーゼ・チェイン** ずれか 1 項に配載のポリペプチドをコードするDNAの 発現を検出する方法。

(4) ~ (6) のいずれか! 項に配戴のDN A または (2.2) 配載のオリゴヌクレオチドを用い、ハ イブリダイゼーション依により、(1)~(3)のいず hか! 斑に配戴のポリペプチドをコードするDNAの変 (52)

行うことを含む、 (1) ~ (3) のいずれか1 項に記載 チドを用い、 ポリメラーゼ・チェイン・リアクションを [0029] (26) (22) 記載のオリゴヌクレオ

特開2001-352986

2

監帯な滑騰組織の活性化を伴う疾患、膵 国智治強を伴う核治史たは神様国間の障害に魅力へ疾患 質β田間の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を 伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、異常な の治療および/または予防のための医薬である。 (3 2) ~ (34) のいずれか! 頃に記載の医薬。

を伴う疾患、膵臓細胞の障害を伴う疾患、異常な破骨細 題、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な様 株芸細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化 間の活性化を伴う模型、異常な免疫細胞の活性化を伴う 疾犯、または異常な細胞増殖を伴う疾患の診断のための 医兼である、 (32) ~ (34) のいずれか | 項に記載 [0034] (38) 困難が、弱現や故値を伴う疾

物路駅、HIV路駅、便性B型肝炎に代表される活動性 【0035】(39) 感染や炎症を伴う疾患が、微生 **園、各種脳脊髄技、もっ血性心不会、エンドトキツンツ** ョック、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性 間原成、外傷性脳振傷虫たは炎症性間疾患であり、異常 な平滑筋細胞の分化増殖を伴う変更が動脈硬化または再 映物であり、異常な糠糠芽細胞の活性化を伴う疾患が肺 り、神経細胞の障害に基づく疾患がアルツハイマー病ま 模様値であり、異常な滑調組織の活性化を伴う疾患がり ウマチ性関節炎または食形性関節炎であり、膵臓 β 細胞 の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活 性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の汚 僚、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増 たは戯血性脳疾患である、 (31) または (38) 記載 慢性肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛 強を伴う処理が急性骨髄性白血肉または駆性腫瘍であ **作行を守む釈囲がアフシボー、アトパー、軸側、右形**

(1)~(3)のいずれか1項 に記載のポリペプチドを用いることを特徴とする、感染 や政信を伴う民間、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う **喫兜、関帯な微粒芽細胞の活性化を伴う痰矩、関常な滑** 関組織の活性化を伴う疾患、膵臓が細胞障害を伴う疾 題、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細 間の活性化を伴う疾患、異常な細胞増殖を伴う疾患また は神経細胞の障害に基づく疾患の治療および/または予 防のための困難のスクリーニング方法。 [0036] (40)

物原果、HIV略果、慢性B型肝炎に代表される活動性 敦煌位であり、以常な清問組織の活性化を伴う疾患がリ 【0037】(41) 感染や炎症を伴う寒患が、衛生 題、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンシ **ョック、吸血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性** な平滑筋細胞の分化性強を伴う疾患が動脈硬化または再 狭窄であり、腎常な糠維芽細胞の活性化を伴う疾患が肺 **領沢虎、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、腎巣** 慢性肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛

ウマチ性関節炎または変形性関節炎であり、膵臓β細胞 の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活 性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活 症、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増 り、神経細胞の障害に基づく疾患がアルツハイマー病ま たは虚血性脳疾患である、(40)配戴の医薬のスクリ 性化を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉 殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または期性腫瘍であ

[0038] (42) (40) または (41) 配載の スクリーニング方法により得られる、(1)~(3)の いずれか!項に記載のポリペプチドに特異的に作用する 医敷 (43) (30) 記載の方法により得られる (1) ~ (3) のいずれか!項に記載のボリペプチドをコードす ることを特徴とする、感染や炎症を伴う疾患、異常な平 滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な繊維芽細胞の活 伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、異常な 細胞増殖を伴う疾患または神経細胞の障害に基づく疾患 るDNAのプロモーター領域および転挙制御領域を用い **解雇 6 細胞障害を伴う疾患、 異常な破骨細胞の活性化を** の治療および/生たは予防のための困薬のスクリーニン 性化を伴う疾患、異常な滑頭組織の活性化を伴う疾患、 グガ供。

物感染、H I V 感染、便性B型肝炎に代表される活動性 【0039】(44) 配染や炎症を伴う疾患が、微生 風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンシ 慢性肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛

類種位であり、異常な滑頭組織の活性化を伴う使用がリ ウマチ性関節炎または変形性関節炎であり、膵臓β細胞 ョック、败血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性 な平滑筋細胞の分化増強を伴う疾患が動脈硬化または再 映省であり、異常な嶽稚芽細胞の活性化を伴う疾患が肺 糖尿病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常 の陣曹を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活 性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活 億、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増 り、神経細胞の障害に基力へ疾患がアルッパイマー病ま たは虚血性脳疾患である、(43)配敷の医薬のスクリ 住化を伴も疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉 殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または悪性腫瘍であ

スクリーニング方法により得られる、(1)~(3)の 【0040】(45) (43)または(44)配戦の のプロモーター領域および転写制御領域に特異的に作用 いずれか! 母に記載のポリペプチドをコードするDNA

(46) (21)配載の抗体を用いることを特徴とす る、(1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチ ドの免疫学的検出法。

(3) のいずれか1項に配戴のボリペプチドを検出する Ê (21) 記載の抗体を用いて、 ことを特徴とする免疫組織染色法。

とを特徴とする、(1)~(3)のいずれか!項に記載 のポリペプチドをコードするDNAの転写もしくは翻訳 ペプチドをコードするDNAの発現が一部または完全に (1) ~ (3) のいずれか1 項に配載のポリ 【0041】(48) (21)配戴の抗体を用いるこ を抑制または促進する物質をスクリーニングする方法。 **哲制されているノックアウト非ヒト動物。**

(1) ~ (3) のいずれか! 扱い記載のポン ペプチドの有する活性が一部または完全に哲制されてい るノックアウト非ヒト動物。

[0042] (51) (1) ~ (3) のいずれか1項

(1) ~ (3) のいずれか」屋に記載のボリスプチドの NFー×B 活性化に対してドミナントネガティブ活性を に記載のポリペプチドを用いることを特徴とする、 有する変異体ポリペプチドのスクリーニング方法。

(51) 配戴のスクリーニング方法により取 得られる、(1) ~ (3) のいずれか1 項に配載のポリ ペプチドのN Fーĸ B 活性化に対してドミナントネガテ ィブ活性を有する変異体ポリペプチド。 (25)

(52) 配載の疫異体ポリペプチドをコード \$ SDNA. (23)

5個である。

(1)~(3)のいずれか1項 (1) ~ (3) のいずれか1 東下記載のポリペプチドの に配載のポリペプチドを用いることを特徴とする、 [0043] (54)

NF-×B活性化に対して該活性化を上昇させる変異を

有する変異体ポリペプチドのスクリーニング方法。

(54) 配載のスクリーニング方法により取 得される、(1)~(3)のいずれか1項に配載のポリ ペプチドのNF-×B活性化能が上昇した変異体ポリペ (22) 74 F.

(55)配敷の発異体ポリペプチドをコード TSDNA. (98)

[0044]

からなる群より遺ばれるアミノ酸配列を有するポリペプ 1.配列番号1~5のいずれかで喪されるアミノ酸配列 **[発明の欺驁の形態] 本発明のボリペプチドとしては、**

より選ばれるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が 欠失、固換ねよび/または付加されたアミノ酸配列から なり、かつNFーĸBの活性を上昇させる活性を有する 2.配列番号1~5で養されるアミノ酸配列からなる群

からなる群より遺ぼれるアミノ酸配列と60%以上の相 司性を有するアミノ酸配列を含み、かつNFー x Bの活 性を上昇させる活性を有するポリペプチドを挙げること 3.配列番号1~5のいずれかで喪されるアミノ酸配列

【0045】上記のアミノ酸配列を有するポリペプチド において1以上のアミノ散が決失、置換および/生たは 付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、Note F、モレキュサー・クローニング鍵2版と略す)、Curr cular Cloning. A Laboratory Manual, Second Editio ent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997 (以下、カレント・プロトコールズ・ n. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (以

ムン・ホフチュシー・パイギロジーが唱す)、Nucleic

知の技術により、次失、国験もしくは付加できる程度の 教であり、例えば、1~数十個、好ましくは1~20 個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~ Acids Research , 10, 6487, (1982) , Proc. Natl. A に記載の邮位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番 号1~5のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチ ドをコードするDNAに邸位特異的変異を導入すること により行うことができる。欠失、固換および/または付 加されるアミノ酸の数は1から数個であり、その数は特 に限定されないが、上配の部位特異的変異導入法等の周 cad. Sci., USA, 79, 6409 (1982) , Gene, 34, 315 (1985) , Nucleic Acids Research, 13, 4431 (198 5) , Proc. Natl. Acad. Sc i USA, 82, 488 (1985)

【0046】また、本発明のポリペプチドとしては、配 列番母1~5のいずれかに配戴のアミノ酸配列と60% ~5のいずれかに記載のアミノ酸配列との相同性は、B 析ソフトで、デフォルト (初期配定) のパラメータを用 は10%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ま 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含む。配列節号! しくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好 LAST (J. Wol . Biol., 215, 403 (1990)) 4PFA STA (Methods in Enzymology, 183, 63-69) 等の解 いて計算したときに、少なくとも60%以上、好ましく ましくは91%以上が好ましい。

- "智安国」)3のできれた一里に記載のボンムプチア **【0047】本発明のDNAとしては、** をコードするDNA

でハイブリダイズするDNAであり、かつ転写因子NF ー k Bの活性を上昇させる活性を有するポリペプチドを 2. 間求項4配銭のDNAとストリンジェントな条件下

3.配列番号6~10のいずれかで独される塩基配列を 有するDNAを挙げることができる。 J-F4SDNA

リペプチドをコードしていれば本発明のDNAに含まれ る。ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするD 【0048】一般に1つのアミノ酸に対して複数種の遺 伝暗号が存在するため、配列番号6~10のいずれかと は異なる塩基配列を有するDNAであっても本発明のポ NAとは、例えば配列番号6、7、8、9または10で 表される塩基配列を有するDNA等の本発明のDNA焦

9

特開2001-352986

たはその一部の形片をプローブとして、コロニー・ハイ プリダイゼーション弦、プローク・ハイブリダイボーツ ヨン故あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション **法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体** 的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定 の塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーシ ョンを行った後、0. 1~2倍濃度のSSC溶液(1倍 **適度のSSC溶液は、150mmo1/1塩化ナトリケ** 代したフィルターを用いて、0. 1~1. 0mol/l を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することによ り同位できるDNAを挙げることができる。 ハイブリダ オロジー、D NACioning 1: Core Techniques. A Practi カレント・プロトコードズ・イン・ホフキュサー・パイ ム. 15 mmol/lクエン酸ナトリウムよりなる) イゼーションは、ホフキュシー・クローコング第2版、 cal Approach, Second Edition, Oxford University, 995等に配載されている方法に準じて行うことができ

(0049)/ペプリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLASTやFASTA等の解析ソフトで、デフォルト (初明版定)のペラメータを用いて計算したときに、配別借申6.7、%、9年次は10で製される協議配別と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、同年しくは70%以上、4り年ましくは90%以上、特に好ましくは90%以上、特に好ましくは90%以上、特に好ましくは90%以上、特に好ましくは90%以上、格が分ることができる。

【0050】以下、本発明を詳細に説明する。 1. 本発明のDNAの翻製

と F m R N A は、市販のもの(例えば、Clontech社製) を用いてもよい。、以下のごとくと ト組織から解製して もよい。、組織から会 R N A を開製する方法としては、チ オシアン線ケアニジン・トリフルタロ酢線セシウム社 (Metbods in Engmology、154.3(19 87)、酸性 チオシアン線ケアニジン・フェメール・クロロフォルム (AGPC) 注(Analytical Blochenistry、162.156(19 87)、東線医学、度、1937(1991))等が挙げられる。 また、全 R N Aから p o l y A・R N A として m R N A を開製する方法としては、オリゴ(4 T) 固定化セルロ ースカラム性(モレキュシー・クローニング類2版)等 が挙げられる。さらに、Fastinack adM A losiation Kit (Invitrogen社製)、砂uck Prep aRM Purification Kit (Phanaacio社製)等のキットを用いることによりm R N A を顕製できる。

(0051) 閲覧したとト語作MRNAからにDNAサイブシリーを存款から、CDNAサイブシリーを製法としては、セフキュロー・グローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モフキュリー・バイギロジー、A Laboratory Manual、2 nd Ed. 1989年に記載された方法、あるいは出版のキット、例えばSuperScript

Plasaid System for cDNA Synthesis and Plasaid Cloning (Life Technologies社製)、スターcDNA Synthesis Life (STRATAGEREM製)をある。 「0 0 5 2」。DNAライブリーを作戦するためのウローニングペクケーとしては、大関値 K 1 2 株中で自力 複製できるものであれば、ファージペクケー、ブラスミドベクター等いずれても使用でき。具体的には、AP Express (STRATAGEREM製)、Ag10 (1993) 1、Lamba AP II (STRATAGEREM製製)、Ag10、Ag11 (DNA cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1983) 1、ATriplix (Clontech社製製)、Ag10 (Ag11 (DNA cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1983) 1、ATriplix (Clontech社製製)、Ag10、CDRATAGEREM製造、Ag10、Ag11 (DNA cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1983) 1、ATriplix (Clontech社製製)、Ag10 (Loning) 3、Ag10 (1983) 1 移去で即じて Gene. 33, 103 (1983) 1 移を執済るととができる。

【0053】宿主衛生物としては、大國郡に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、becherichio coll XII-Blue MFP「STAINGENE社」を conseries 6 ol (most) Enterioris

W. Strategles, §. 81 (1992)), Escherichia coll G600 (Genetics, 39, 440 (1954)), Escherichia coll Y1088 (Science, 222, 778 (1983)), Escherichia coll Y1090 (Science, 222, 778 (1983)), Escherichia coll Y1052 (J. Wol. Biol., 166 1 (1988) 3)), Escherichia coll X105 (Wol. Biol., 16 1 18 (1966)), Escherichia coll J1105 (Gene, 38, 2 78 (1985)) \$\$\psi \$\psi \$\

[0054] この c DN A ライブラリーを、そのまま以下の解析に用いてもよいが、不完全表 c DN A の割合を下げ、なるべく完全表 c DN A を測まく 取得するため [1. 智野らが開発したオリゴキャップ在 [Gene. 138. 1] (1994)、Gene. 138. 1] (1994)、Gene. 138. 1] (1994)、現場医学、11. 2491 (1993)、第五子イブラリーの作製法、羊土社(1994))を用いて軽裂した c DN A ライブラリーを以下の解析に用いてもよい。 (10055) 神製した c DN A ライブラリーを以下の解析に用いてもよい。 (10055) 神製した c DN A ライブラリーから各クロ、 c mas 1 作製した c DN A ライブラリーから各クロ、 c mas 1 に mas 1 に

10055] 仲製した c DN Aライブリーから各クローンを単離し、それぞれのクローンについて c DN Aの塩基配列条が増加、それぞれのクローンについて c DN Aの低、例えばサンガー (Sanger) 5のジデオキシ茂 (Proc. Matl. Acad. Sci. USA, 19463 (1977)] あるい Losystemは製) 等の塩基配列が新雄配を用いて分析することにより、核DN Aの塩基配列を決定する。得ちれた塩基配列を入ました。核DN Aの塩基配列を決定する。得ちれた塩基配列を下まく様配列に翻訳することにより、このDN Aがコードするポリペプチドのアミン酸配列を得ることができる。

【0056】また、得られた塩基配列をCenBank、EMBL等の塩基配列データベース中の塩基配列とBLAST、FASTA等の相同性解析プログラムを用

いて比較することにより、得られた塩基配別が新規な塩 基配列かどうか、また得られた塩基配別と相同性をもつ 塩基配別を検索することができる。また塩基配別より得 られたアミノ酸配別をとい」s s P root、P 1 R、G e n P e p t 等のアミノ酸配別データベースと比較する ことにより、その塩基配別がコードするボリベブチドと 相同性をもつボリベブチド、例えばラットとは別の生物 種での相当する遺伝子に由来するボリベブチドと何に生まる。 うな活性や傷能をもつと推定されるファミリータンパケ 質を検索することができる。

【0057】 データベース検索で明らかになった相同道

佐子の協基配列を基に、鉄道伝子に特別的なプライマーを設計し、上記のようにして取得した一本側に DNA まんは c DNA ライブラリーを課型としてPC Rを行う。 相種所片が場られた際には、設断片を選出なプラスミドにサプローニングする。サブクローニングは、指面所片をその章ま、あるいは制題酵業や DNA ポリメラードできての章ま、あるいは制理酵業や DNA ポリメラーで処理後、定法によりベクターに超込むことにより行うことができる。ベクターとしては、pluescript SK(-)(Strategene社製)、pTRET(Nucreic Acid a Research, 18、6091091))、CR. Script Amp SK(-)(Strategene社製)、pTRBue(Nowagen社製)、pTRI(Invitrogen社製)、pTR Nucleucht型)、pRTRU(Combunter社製)、pNR Invitogen社製)、pCR-TRA(Combunter社製)、pNR Invitogen社製)、pNR-TRA(Genebunter社製)、pNO TAM(5 1-3

【0058】配別番号6~10のいずれかの塩基配別が 5なるDNAが一旦取得され、その塩基配別が決定され た後は、終塩基配別の5・増および3・縄の塩基配別に 基づいたプライマーを開製し、ヒトまたは非ヒト動物の 組織または細胞に含まれるmRNAから合成した。DN AあるいはcDNAライブジリーを用いてDNAの増縮 を行うことにより、本発明のDNAを取得することがで をる

社製) 等を挙げることができる。

【0059】また、配列番号6~10のいずれかの複為 配列よりなるDNAの全表あるいは一郎をプロープとして、ヒトまたは非ヒト動物の組織または翻配に合まれる TNAからら成した。DNAあるいは。DNAウイブ ラリーに対してコロニーハイブリダイゼーションやブラ ーンハイブリダイゼーション(モレキュラー・クローニ ング類2版)を行うてとにより、本発明のDNAを取得 することができる。

【0060】決定されたDNAの指基配列に基づいて、ポスフォアミダイト往を利用したパーキン・エルマー社のDNA台版機 (model 392) 等のDNA合成機で化学合成することにより、本発明のDNAを取得することもできる。本規則のオリゴダレンギドとしては、オリゴDNN、オリゴRNM等のオリコダクレオチド、結まびありカナリエド)等が挙げられる。

1 レオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド

時間2001-352986

(以下、アンチセンスギリゴタウェギド)として、例 えば、検出したいmRNAの一部の協議配列において、 5. 茶糖間の協議配列に相当するセンスプライマー、 第. 米糖間の協議配列に相当するアンチセンスプライマー、 一等を挙げることができる。ただし、mRNAにおいて ウラシルに相当する協路は、オリゴヌクレオチドプライマーにおいてはおいて

[0062] センスプライマーおよびアンチセンスプラ イマーとしては、両者の融解温度(Tm)および塩基数 が極端に変わることのないオリゴヌクレオチドで、5~ 60協議、好ましくは10~50協議数のものが挙げら レオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエ れたもの、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プ スで置換されたもの等が挙げられる (細胞工学, 16, 14 れる。既導体オリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌク 一ト結合に交換されたもの、オリゴヌクレオチド中のリ ン酸ジエステル組合がN3.-P5.ホスフォアミデート スとリン酸シエステル結合がペプチド核酸結合に変換さ ロアコルケシシルで国校されたもの、オリゴヌクレオチ ド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで配換され たもの、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロ ピニルシトシンで国校されたもの、オリゴヌクレオチド **中のシャシンだフェノキキシン物館シャシン(Dhenoxaz** 協合に突破されたもの、オリゴヌクレオチド中のリボー Ine-modified cytosine)で間換されたもの、オリゴヌ クレオチド中のリボースが2、メトキシエトキシリボー 53 (1997))

(1) 活性検出に用いる宿主細胞

本発明において、DNAの活性を検出するために用いる 街主棚位としては、DNAを棚間均に導入できる細値な いかなる細胞も用いることができる。鮫間胞として、 例えば、細菌・古細菌、凝乳、筒類、植物、動物等に由 来した細胞が挙げられる。具体的には、下配生物由来の細胞が挙げられる。

[0064] 細菌・古細菌としては<u>facterichla_coll</u>や Bocillus_aubtills等が挙げられる。 廉領としては<u>Sonce</u> hococcus属やSoncehocystis属の監備等が挙げられる。 植物としてはタバコ、アラビドブシス、トマト、ジャガ イモ、ナタネ、ワタ、ダイズ、イネまだドウチロコジ 等が挙げられる。 超類としては<u>Saccharowyces_cerevist</u> ae^{*}や<u>Lores Illus_ntgr</u>等が挙げられる。 動物としては 确乳動物、節足動物等が執げられる。 動物としては

【0065】暗乳動物としてはヒト、サル、マウス、サット、モルモットまたはミンク等が挙げられる。 耳体的には、ヒトの細胞としてはT細胞株」=「ドュー(アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(以下、AI CC比略記する)の毎号IIB-512の細胞株)、H細胞株N

8

【0061】 眩オリゴヌクレオチドまたは眩オリゴヌク

玉細胞に遺伝子を導入する方法であればどのような方法 本発明のDNAを宿主細胞に導入する方法としては、宿 でも用いることができる。例えば、エレクトロボレーシ ーズ4. (3) 、ワクシニアウイルス法 (年土社 バイオマニュアルシリーズ4, 59) レトロウイルスペクター法 ュアルシリーズ 4.15)、リポフェクション法(年土社 ュクション法(年土社 パイオマニュアルシリーズ4.3 0)、アデノウイルス法(年士社 バイメマニュアルシリ バイオマニュアルシリーズ4, 28)、マイクロインジ (年七社 パイポヤニュアルシリーズ4, 14) 毎の公当 リン酸カルシウム法(羊土社 パイオマニュアルシリー ズ4. 13)、DEAEデキストラン法(羊土社 パイオマニ ョン法(羊土社 パイオマニュアルシリーズ4. 23)、 【0066】(2) 相主細胞への遺伝子導入法 の方法を用いることができる。

住化を検出することが可能な方法を用いることにより本 × Bを活性化できるため、簡配におけるNFー×Bの活 発明のDNAを取得することができる。NF-xBの洛 本発明のDNAは、細胞で発現させることによりNFー IxBのリン酸化やユピキチン化をウエスタンプロット り検出する方法が挙げられる。また、さらに効率よく検 **法(単土社 パイオマニュアルシリーズ7. 179) 移によ** 出する方法として、レポーター適低子を用いて検出する **ターガラクトシダーゼ、ウロキナーゼ、クロラムフ** ュニコールアセチルトランスフェラーゼ、ヒト成長ホル モン、各種Greenfluorescent protein (以下、GFP) 性化を検出する方法として、以下の方法が挙げられる。 転写制御領域への結合をゲルシフト法 (羊土社 パイオ は、ルシフェラーゼ、ヒト胎盤アルカリ・ホスファター 【0068】例えば、細胞抽出液を用いる方法として、 マニュアルシリーズ 5.107) 等により解析する方法、 方法を挙げることができる。レポーター遺伝子として [0067] (3) 本発明のDNAを収得する方法

等をコードする遺伝子を用いることができる。 レボータ 一選伝子に連結するプロモーターとしては、NFーĸB により転写されうるプロモーターであるならいかなるプ ロモーターも用いることができる。例えば、NF-kB 出すことにより単橋したプロモーターDNA断片、染色 体DNAを創型としてPCR法によって問題することに ター領域を染色体DNAから制限酵素消化によって切り よって得られるプロモーターDNA断片、または骸プロ モーターの協島配列を存する合成DNA断片等が挙げら の活性化により発現が制御されている遺伝子のプロモー

[0069] 具体的には、11ー1g、11ー1β、1 TNF-a, TNF-B, IFN-B, M-CSF, G ブリン、LAMー1、VCAMー1、ICAMー1、目 S, COX-2, VEGF-R2, c-Rel, p10 HIV-2、SIVmac、CMV、HSV-1、SV 40、アデノウイルス等のプロモーターやそれらのコン C、T面積レセプターβ、M3Cクラス1、β2-ミクログロ 衛アミロイ FA的窓タンパク質、アンギオテンシノーゲ 5. 1 x B a, c - My c, 1 R F - 1, H 1 V - 1, センサス配列を1個あるいは複数個有した合成プロモー 1-2, 11-3, 11-6, 11-8, 11-12, ン、補体因子B、補体因子C3、補体因子C4、、1NO M-CSF, G-CSF, L-2Ra, 18-x-L ター等が挙げられる。

間を簡重とすることが好ましい。

上記プロモーターにレポーター遺伝子を連絡した転写コ ニットを作製した後、その転写コニットを宿主細胞の染 色体に組み込んだ細胞株を作製する。この細胞内に本発 明のDNAを発現するユニットを導入し本発明のDNA を発現させた後、レポーター遺伝子の発現量を測定する ことにより、NFー×Bの活性化を検出できる。あるい は、上記プロモーターにレポーター遺伝子を連結した転 写ユニットを作製した後、該転写ユニットと本発明のD NAを発現するユニットの二つのユニットを同時に宿主 粗悶に導入し、レポーター遺伝子の発現量を測定するこ 【0070】レポーター遺伝子を用いた検出方法では、 とにより、NF-xBの活性化を検出できる。

本発明のポリペプチドは、モレキュラー・クローニング 類2版やカレント・プロトコールズ・イン・モフキュラ 以下の方法により、本発明のDNAを宿主細胞中で発現 一・パイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば 【0071】3. 本発明のポンペプチドの製造

させて、製造することができる。

て、敗ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さ DNAを適当な発売ペクターのプロモーターの下流に描 **入することにより、粗換えベクターを作製する。 眩粗換** えくクターを、販発現くクターに適合した宿主知覧に導 入することにより、本発明のポリペプチドを生産する形 のDNA断片を闢製する。核DNA断片、または全長の 【0072】全長cDNAをもとにして、必要に応じ

Ê

時間2001-352986

質気技体を得ることができる。

きるものであればいずれも用いることができる。発現べ クターとしては、上記宿主細胞において自体複製可能な 郡、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現で いしは染色体中への組込みが可能で、本発明のポリペプ チドをコードする DNA を転写できる位置にプロモータ 【0073】宿主相酌としては、相歯、酵母、動物細 一を含有しているものが用いられる。

場合は、本発明のポリペプチドをコードするDNAを含 有してなる組換えベクターは原核生物中で自律複製可能 本発明のポリペプチドをコードする遺伝子、および転写 【0074】細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる い。道、ベクターには、プロモーターを制御する遺伝子 であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、 样植配列より構成されたベクターであることが好まし が合まれていてもよい。 (Boehrin ger Mannheim社製)、pBTaci (Boehringer M 製)、pKYP10 (特開昭5 8-110600号)、pKYP200 (Agric 9)) , pGEL1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 BP-5407) より開製)、pTrS32 (Escherichia coli JN10 9/pTr532 (FERN BP-5408) より研製)、pGNA2 (<u>Eschert</u> <u>chia coli</u> IGIA2 (FER N BP-400) より研製、特開報Go-221091号)、pGNA2 (<u>Eschertchia coli</u> IGNA2 (FENN BP -6798) より類製、特開昭60-221091号)、pferm2 (米国 4, pEC400 (J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)), pG 特群第4,686,191号、米国特群第4,939,094号、および米 ーム結合配列であるシャインーダルガーノ (Shine-Dalga 製), pTrS30 (Escherichia coli JN109/pTrS30 (FERN 国特群第5,160,735号)、pSupex、pUBI10、pTP5、pC19 rno)配列と開始コドンとの間を適当な距離(例えば6~1 EX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製)等 を挙げることができる.発現ペクターとしては、リボソ annheim社製 、pBTac2 (Boehringer Mannheim社製) pKK233-2 (Pharmacia社製)、pSE280 (Invitrogen社 製)、pGEMEX-1(Promega社製)、pQE-8(QIAGEN社 4)) , pLSAI (Agric. Bil o. Chem., 53, 277 (198 (1985))、pBluescript II SK(-) (Stratagene社 ultural. Biological. Chemistry., 48, 669 (198 8塩基)に関節したものを用いることが好ましい。

【0076】プロモーターとしては、宿主細胞中で発現 できるものであればいかなるものでもよい。例えば、止 ター、Prプロモーター、17プロモーター等の、大阪商や ファージ等に由来するプロモーターおよび、SP01プロモ ーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等を挙げ に人為的に設計改変されたプロモーター等も用いること pプロモーター(Ptrp)、<u>lac</u>プロモーター、Ptプロモー ることができる。また、Ptrp を2つ直列させたプロモー $9-(P_{UP} \times 2) \times \frac{tac}{10} = -9-(P_{UP} \times 2)$ 一、letlプロモーター (Gene, 44. 29 (1986)) のよう

塩葉を固換することにより、目的とするポリペプチドの 【0011】本発明のポリペプチドをコードする部分の ターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配 列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写 生産帯を向上させることができる。本発明の超換えベク 塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、 終結配列を配置することが好ましい。

チア属、パチルス属、プレビパクテリウム属、コリネパ 【0078】宿主相酌としては、エシェリヒア属、セラ クテリウム層、ミクロバクテリウム層、シュードモナス 届等に属する微生物、例えば、Escherl chia coll XLI-DHI. Escherichia coli NC1000, Escherichia coli NY3 276, Escherichia coli W1485, Escherichia coli JW10 9. Escherichia coli W3110, Escherichia coliNY49, S ntum ATCC13869, Corynebacterium glutamicum ATCC130 err atla ficaria, Serratia fonticola, Serratia 119 Brevibacterium saccharolyticum ATCC14068, Brevibac s. Bacillus amyloliquefacines. Brevibacterium ammo terium flavum ATCC14067, Brevibacterium lactoferme Blue, Escherichia coli XL2-Blue, Escherichia coli 9. Escherichia colliMBiOl. Escherichia coll No. 4 uefaciens, Serratia marcescens, Baci Ilus subtill niagenes, Brevibacterium immariophilum ATCC14068,

【0075】発現ペクターとしては、例えば、paTrp2

3.2. <u>Microbacterium ammoniaphilum</u> AIGCI5354. <u>Pseud</u> omonnasu sp. D-0110夢を挙げることができる。 【0079】超換えベクターの導入方法としては、上配 ることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用い (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (197

は、Gene, <u>17</u>, 107 (1982) やNoie cular & General G enetics, <u>168</u>, 111 (1979) に配配の方法等を挙げるこ 2)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394号)、また とができる。

【0080】酵母を宿主細胞として用いる場合には、発 現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115) 、YEp2 4 (ATCC37051) 、YCp50 (ATCC37419) 、pHS19、pHS15等 を挙げることができる。プロモーターとしては、群母的 株中で発現できるものであればいずれのものを用いても よく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子 一、CAPプロモーター、ADHプロモーター、gallプロモー プロモーター、NFI プロモーター、CUPIプロモーター等 ター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質 のプロモーター、PHO5プロモーター、PCKプロモータ

セス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cere [0081] 宿主細胞としては、サッカロミセス属、ウ リュイムロロセス層、トリコスボロン層、ツェワニギロ Asiae, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyce s

lactis, Trichosporon pullulans, Schwanniomyces all

ェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA,84, 192 163 (1983)] , (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1 方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればい ずれも用いることができ、倒えば、コフクトロポワーツ ヨン法 (Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)) 、スフ D (1978)]、酢酸リチウム法 ①. Bacteriolog y. 153. nvins等を挙げることができる。 組換えベクターの導入 929 (1978)) 記載の方法等を挙げることができる。

33(1990)), pAS3-3 (KMMF2-227075), pCDNB (Nature, 329, 840 (1987)), pcDNAI/A mp (Invitrogen# 【0082】動物細胞を宿主として用いる場合には、発 呪くクターとして、例えば、pcDNAI、pcDN8(フナコツ社 製)、pAGE107 (特別平3-22979: Cytotechnology, 3. 1 双)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103 (J. Biochem istry, <u>101</u>, 1307 (1987))、pACE210等を挙げることが

【0083】プロモーターとしては、動物細胞中で発現 ば、サイトメガロウイルス(CMV)のIE(immediat モーター、フトロウイルスのプロモーター、メタロチオ CMVのIE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共 e enrly)適伝子のプロモーター、SV40の初限プロ ネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、S Raプロモーター等を挙げることができる。また、ヒト できるものであればいずれも用いることができ、例え

に用いてもない。

できる。粗換えベクターの導入方法としては、動物細胞 logy. 3. 133 (1990))、リン酸カルシウム法(特間平2 -227075) 、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. S H. Freeman and Company, NewYork (1992), Blo/Technolo 【0084】 街主細胞としては、ヒトの細胞であるナマ ルバ(Namalwa)価格、サルの組造であるCOS 笛覧、チャイニーズ・ハムスターの超階であるCHO値 **覧、HBT5637(特別昭63-298) 神を挙げることが** にDNAを導入する方法であればいずれも用いることが でき、例えば、エレクトロポレーション法 (Cytotechno 【0085】 路虫細胞を宿主として用いる場合には、例 パイギロジー・サプリメント1-38 (1 987-1997)、Bacul ovirus Expression Vectors. A Laboratory Hanual. W. gy. ē. 47 (1988)等に配載された方法によって、本発明 えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・ ci. USA. 84. 7413 (1987)] 等を挙げることができる。

【0086】即ち、超数え適位子導入くクターおよびパ キュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上 入ペクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pB1u :Bucill (ともにInvitorogen社製) 等を挙げることがで 滑中に紐換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルス **を取虫細體に感染させ、本発明のボリペプチドを発現さ** せることができる。散方法において用いられる遺伝子尊 のポリペプチドを粗肌することができる。

s)等を用いることができる。昆虫細胞としては、Spodop tera frugiperdaの卵巣細胞であるSF9、Sf21(B 1, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、<u>Trichoplusia ni</u>の射巣細胞であるHigh5(Invitrog 【0087】パキュロウイルスとしては、例えば、夜盛 リフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス 機科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カ (Autographa californica nuclear polyhedrosis viru aculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manua en社製)等を用いることができる。

【0088】組換えウイルスを翻製するための、昆虫細 は、発現ベクターとして、例えば、T1プラスミド、タ **問への上記組換え遺伝子導入ペクターと上記パキュロウ** イルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウ ム法 (特開平2-2270 75) 、リポフェクション法 (Proc. **ことができる。植物細胞を宿主細胞として用いる場合に** Natl. Acad. Sci. USA, 84,7413 (1987)) 等を挙げる ここしたゲイクウインスペクター部を推げることができ

モ、トマト、ニンジン、ダイズ、アプラナ、アルファル ファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等を挙げる 【0089】プロモーターとしては、植物細胞中で発現 できるものであればいずれのものを用いてもよく、例え ぱ、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35 Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター都を推げ ることができる。宿土価間としては、タバコ、ジャガイ ことができる。

【0090】組換えベクターの導入方法としては、植物 とができ、例えば、アグロバクテリウム(Agrobacterlu パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法(特許第26 細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いるこ m) (特開昭59-140885, 特開昭60-70080, W094/0097 7)、エレクトロポレーション法 (特間昭60-251887)

【0091】遺伝子の発現方法としては、直接発現以外 に、モレキュラー・クローニング類2版に配載されてい 5.方法等に体じて、分泌生産、配合ポリペプチド発用等 を行うことができる。酵母、動物細胞、昆虫細胞または 植物細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が 06856、特許第2517813)等を挙げることができる。 付加されたポリペプチドを得ることができる。

クターを保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中 【0092】本発明のDNAを組み込んだ組換え発現べ に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より 眩ボリペプチドを採取することにより、 鮫ボリペプチド を製造することができる。大脳関等の原核生物あるいは 群母等の具核生物を宿主として得られた形質転換体を培 蒙する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素 県、無機塩類等を合有し、形質転換体の培養を効率的に 行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用い

特開2001-352986

(16)

【0093】炭素原としては、核生物が質化し得るもの ķΦ リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモ ン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カ 0~9.0に保持する。pHの問整は、無機または有機 ス、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン **白水分解物等の炭水化物、酢酸、プロパオン酸等の有機** 数、エタノール、プロパノール等のアルコール製等を用 いることができる。窒素源としては、アンモニア、塩化 【0094】無機塩としては、リン酸第一カリウム、リ ン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシ **ウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫** は、通常振躍培養または深部通気撹拌培養等の好気的条 件下で行う。培養温度は15~40℃がよく、培養時間 種発酵歯体およびその消化物等を用いることができる。 アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、 ニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプト は、通常16時間~1日間である。培養中のpHは3. 酸鋼、炭酸カルシウム等を用いることができる。培養 であればよく、グルコース、フラクトース、スクロー ゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、

【0095】また、培養中必要に応じて、アンピシリン やテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよ プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた 組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときに は、必要に応じてインデューサーを始地に欲加してもよ で形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した徴 - β - D - チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trp 生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA) い。例えば、<u>16c</u>プロモーターを用いた組換えベクター 等を培地に添加してもよい。

を培養する培地としては、一般に使用されているRPM l Association, 1<u>99</u>, 519 (1967)]、EagleのME M培地 (Science, <u>122</u>, 501(1952)]、ダルペッコ改変 (Proceeding of the Society for the Biolog Ical Ne 件下で1~7日間行う。また、培養中必要に応じて、カ 【0096】動物細胞を宿主として得られた形質転換体 11640培地 (The Journal of the American Medica dicine, <u>73</u>. 1 (1950)) またはこれら培地に牛胎児血済 **等を添加した培地等を用いることができる。培養は、通** MEM培地 (Virology, §, 396 (1959)]、199培地 pH6~8、30~40℃、5%CO2存在下等の条

【0097】昆虫細胞を指主として得られた形質転換体 を培養する培地としては、一般に使用されているTNN-FH 培地 (Pharmingen社製)、Sf-900 11 SFM培 也 (Life Technologies社製)、ExCel1400、

トレイツン、ペコシリン等の抗生物質を培地に恐怕した

製)、Grace's Insect Medium (Na ~5日間行う。また、培養中必要に応じて、ゲンタマイ ture, 195, 788 (1962)) 等を用いることができる。培 集は、通常 b H 6 ~7、25~30℃等の条件下で、 ExCell405 いずれもJRN Blosciences社 シン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0098】植物細胞を宿主として得られた形質転換体 は、細胞として、または植物の細胞や器質に分化させて 培養することができる。飲形質転換体を培養する培地と しては、一般に使用されているムランゲ・アンド・スク ーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこ 帯pH5~9、20~40℃の条件下で3~60日間行 う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグ れら始地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモ ンを添加した培地等を用いることができる。培養は、通 ロマイシン等の抗生物質を協地に添加してもよい。

胞外膜上に生産される場合、ポールソンちの方法 (J.B) oc. Natl. Acad. Scl. USA, 86, 8227 (1989), Genes D evelop., 4, 1288 (1990))、または特閒平5-338963、W 094/23021等に配像の方法を準用することにより、較ポ せる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法が あり、使用する値虫粗配や、生魔させるポリペプチドの は、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌さ る。本発明のポリペプチドが信主価間内あるいは信主価 iol. Chem., <u>264</u>, 17619 (1989)]、ロウちの方法 (Pr リペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることがで 構造を変えることにより、胶方法を選択することができ 【0099】本発明のポリペプチドの生産方法として

R

の数、アルカリ箔液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニ

ア等を用いて行う。

本発明のポリペプチドの活性部位を含むポリペプチドの 分泌させることができる。また、特開平2-227075に配<mark>設</mark> されている方法に増じて、ジとドロ媒酸還元酵素遺伝子 手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させること **等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させる** により、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に 【0100】すなわち、遺伝予組換えの手法を用いて、

体(トランスジェニック植物)を造成し、これらの個体 る。形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通 【0101】さらに、遺伝子導入した動物または植物の 細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動 **常の方法に従って、飼育または栽培し、核ポリペプチド** ペプチドを採取することにより、眩ボリペプチドを製造 物価体(トランスジェニック非ヒト動物) または植物圏 を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より核ポリ を用いて本発明のポリペプチドを製造することもでき することができる。

製造する方法としては、例えば公知の方法(American J 【0102】動物個体を用いて本発明のポリペプチドを ournal of Clinical Nutrition, <u>63</u>, 6395 (1996), Ame

8

rican Journal of Clinical Nutrition, <u>63</u>, 6275 (199 8) 、Bio/Technology, <u>9</u>, 830 (1991)) に降じて遺伝子 を導入して造成した動物中に本発明のポリペプチドを生 rican Journal of Clinical Nutrition,

【0103】動物個体の場合は、例えば、本発明のポリ ペプチドをコードする DNA を導入したトサンスジェー ック非ヒト動物を飼育し、酸ポリペプチドを酸動物中に 生成・韓値させ、数動物中より数ポリペプチドを採取す る。 鼓動物中の磐積場所としては、例えば、鼓動物のミ 3. この際に用いられるプロモーターとしては、動物で が、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターであるαカ ゼインプロモーター、 タカゼインプロモーター、 タラク トグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロ 発現できるものであればいずれも用いることができる ることにより、鮫ポリペプチドを製造することができ **ルク (特閒昭63-309192) 、卵等を挙げることができ** モーター等が好道に用いられる。

コードするDNAを導入したトランスジェニック植物を 公知の方法 (組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (199 5)、Trends In Blotechnology、<u>15</u>, 45 (1997))に準じて程度し、技ポリペプチドを厳植物中に生成・蓄積さ 【0104】 植物価体を用いて本発明のポリペプチドを 製造する方法としては、例えば本籍明のポリペプチドを ゆる。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られ り、酸ポリペプチドを生産する方法が挙げられる。 【0105】本発明の形質転換体により製造されたポリ 分離により回収し、水系援衝液にけん関後、超音波破砕 一、ダイノミル等により粗智を破砕し、無阻散抽出複を る上溢から、道祐の群教の坦龍舞製法、即ち、治媒抽出 法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による法殿 ス、DIAIONHPA-75 (三菱化成社製) 等レジ アロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた数 ペプチドは、倒えば本発明のポリペプチドが、面積内に 溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心 ンを用いた略イオン交換クロマトグラフィー法、SーS epharose FF (Pharancia社製)等のレジンを 用いた聞イオン安核クロマトグラフィー法、ブチルセフ 在、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフ **ェーカシンが在、毎年点四気決動等の職気決動法等の手** せ、戯植物中より戲ポリペプチドを採取することによ 種、フワンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザ 在、ジエチルアミノエチル (DEAE) ーセファロー **水粒クロマトグラフィー社、分子都を用いたゲルろ過**

8 をタンパク質度性刺で可溶化する。数可溶化液を特釈虫 【0106】また、数ポリペプチドが細胞内に不溶体を **過心分離を行うことにより、沈既固のとしたポリベンを** ドの不格体を回収する。回収したポリペプチドの不裕体 形成して発現した場合は、回数に簡諧を回収後限はし、

法を単独あるいは組み合わせて用い、情製権品を得るこ

たは過折することにより、骸ポリペプチドを正常な立体 構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により酸ポリ ペプチドの精製標品を得ることができる。

【0101】本発明のポリペプチドあるいはその勧修飾 体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上滑 回収することができる。即ち、販格養物を上記と同様の 遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分 を取得し、該可溶性回分から、上配と同様の単離精製法 に胶ポリペプチドあるいはその雑銭付加体等の観導体を を用いることにより、精製糖品を得ることができる。

【0108】また、本発明のポリペプチドは、Fmoc 狂(フルオレニルメチルオキシカルボニル社)、 t Bo c 法(t ープチルオキシカルボニル法)等の化学合成法 によっても製造することができる。また、Advanced Che al ech社, Perkin-Elmer社, Amersham Pharmacia Biote ch社, Protein Iec hnology instrument社, Synthecell -Vega社、PerSeptive社、最高数件所等のペプチド合成 **概を利用して化学合成することもできる。**

【0109】4.本発明のポリペプチドを配置する抗体

して用いることにより、ポリクローナル抗体、モノクロ ボリペプチドの精製標品、あるいは本発明のポリペプチ ドの一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチドを抗原と 本発明のポリペプチドまたは骸ポリペプチドの部分断片 **ーナル抗体等、本発明のポリペプチドを配置する抗体を**

[0110] (1) ポリクローナル抗体の作製 作製することができる。

本発明のポリペプチドの全長または骸ポリペプチドの節 として用い、適当なアジュバント (例えば、フロイント 分断片ポリペプチドの精製類品、あるいは本発明のポリ の完会アジュパント(Complete Freund's Adjuvant)また は水酸化アルミニウムゲル、百日咳ワクチン等)ととも に、動物の皮下、静脈内または腹腔内に投与することに ペプチドの一部のアミノ駿配列を有するペプチドを拉服 よりポリクローナル抗体を作製することができる。

ができる。 散抗原の投与菌は動物 1 四当たり 5 0~1 0 0 μgが好ましい。ペプチドを用いる場合は、ペプチド 【0111】投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3~ 20週令のラット、マウス、ハムスター等を用いること をスカシガイへモシアニン (keyhole limpet haemocyan In)や牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合さ せたものを抗原とするのが留ましい。 抗原とするペプチ ドは、ペプチド台成棚で合成することができる。

眼底静脈體より探血し、眩血清が免疫に用いた抗原と反 【0112】鮫抗原の投与は、1回目の投与の後、1~ 2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に **応することを酵素免疫倒定法(酵素免疫倒定法(EL1** SA法):医学盘院刊(1976年)、Antibodies-A Labor atory Wanual, Cold Spring Harbor Laboratory (198 8) 等で確認する。

な抗体価を示した非とト哺乳動物より血清を取得し、骸 強心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩 【01.13】免疫に用いた抗原に対し、その血清が充分 血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を 等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合 析、カプリル酸沈殿(Antibodies,A Laboratory manua プロテインA または G ーカラムあるいはゲル循過カラム 取得することができる。分離、精製する方法としては、 Cold SpringHarbor Laboratory. (1988)]、または DEAE-セファロースカラム、降イオン交換カラム、

【0114】(2)モノクローナル抗体の作製 わせて処理する方法が挙げられる。 (a) 抗体磁性細胞の腐製

9

ラットに抗原物質を最終投与した後3~7日目に、脾臓 チドに対し、その白油が十分な抗体値を示したラットを **的格に用いた本発明のポリペプチドの部分断杆ポリペプ** 抗体産生細胞の供給源として供する。酸抗体価を示した

を摘出する。

西腔つ、 パンカットではぐし、 1・200rpmに5少 [0115] 乾醇麗をMEM培地 (日水製薬社製) 中で 間違心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の 5)で1~2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培 **陣細胞をトリスー塩化アンモニウム緩衝液(pH7.6** 地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として

骨値間細胞としては、マウスまたはラットから取得した 株化細胞を使用する。例えば、8ーアザグアニン耐住マ ミン (1、5mmo l/l)、2ーメルカプトエタノール (5×10³mo l/l)、ジェンタマイシン (10 ウス(BALB/c由来)骨値随細胞株P3-X63A 88-U1(以下、P3-U1と略す) (Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81. 1 (1978), Europ. J. Immun ol., 6, 511 (1976)], SP 2 / 0 - A g 1 4 (SP μ B / m 1) および牛胎児血清 (F C S) (CSL社製、1 0%)を加えた培地(以下、正常培地という)に、さら で格代するが、細胞酸合の3~4日前に正常培地で培養 9)], P3-X63-Ag8 (X63) (Nature, 256, 495 (1975)) 等を用いることができる。これらの細胞 に8ーアザグアニン(15μg/ml)を加えた培地] 2) (Nature, 276, 269 (1978)), P3-X63-A g 8 6 5 3 (6 5 3) U. Immunol., 123, 1548 (197 株は、8 —アザグアニン培地 [RPNI-1640培地にグルタ し、融合には該細胞を2×107個以上用いる。 [0116] (b) 骨髄腫細胞の腐製

(6)で取得した抗体療生細胞と(6)で取得した骨輪腫細胞 **蒸留水1リットル、pH7.2)でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞:骨砂糖細胞=5~10:1になるよ** をMEM焙地またはPBS(リン酸ニナトリウム1.8 38、リン酸一カリウム0. 218、食塩7. 658、 【0111】 (c) ハイブリドーマの作数

う眠合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、

特開2001-352986

【0118】得られた沈殿画分の钼散群をよくほぐし、

田智あたり、ポリエチフングリコールー1000(PE 0. 2~1 m 1 校 打し、さらに 1~2 分 間 毎 に M E M 埳 核細胞群に、攪拌しながら、37℃で、10゚抗体産生 G-1000) 2g, MEM 2ml およびジメチルス ルホキシド (DMSO) 0. 7mlを混合した溶液を 地1~2mlを数回路加する。 【0119】 磁加後、MEM増地を加えて全価が50m 分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細 間を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込 み、吹出しでゆるやかにHAT焙地 [正常培地にヒポキ 0.4 mol/1) およびアミノブチリン (4×10"m 【0120】 数懸濁液を96穴培養用プレートに100 manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 本発明のポリペプチドの部分形片ポリペプチドに特異的 1になるように弱製する。 核弱製液を900rpmで5 サンチン (104mo1/1)、チミジン (1.5×1 邸をとりアンチボディイズ (Antibodles, A Laboratory #1/穴ずつ分注し、5%COz/ソキュペーター中、 37℃で7~14日間培養する。培養後、培養上海の-(1988)) 等に済べられている群戦免疫資底法により、 ol/1)を加えた倍地]100ml中に懸調する。

【0121】酵素免疫測定法の具体的例として、以下の 方法を挙げることができる。免疫の際、抗原に用いた本 レートにコートし、ハイブリドーマ培養上消もしくは後 質あるいは放射線化合物等で爆騰した抗ラットまたは抗 マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質 に応じた反応を行ない、 本発明のポリペプチドに特異的 発用のポンペプチドの部分断下ポンペプチドを適当なブ 述の(d)で得られる特製抗体を第一抗体として反応さ **せ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物** に反広するものを本発明のモノクローナル抗体を生産す るハイブリドーマとして選択する。

8

に反応するハイブリドーマを選択する。

目は、正常培地を使用する)、安定して強い抗体価の配められたものを本発明のモノクローナル抗体を産生する 【0122】 鮫ハイブリドーマを用いて、囮界希釈法に よりクローニングを2回繰り返し(1回目は、HT焙地 (HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回 ハイブリドーマ株として選択する。

マウスに、(c)で取得した本発明のポリペプチドに対 プリスタン処理 (2. 6. 10. 14ーテトラメチルペ ンタデカン (Pristane) 0. 5mlを腹腔均投与し、2 週間飼育する〕した8~10週令のマウスまたはヌード するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞5~2 0×10⁶細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日 (d) モノクローナル抗体の関数

間でスイブリドーでは関水橋化する。

(S)

同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得すること ができる。抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクロ 5。仰られた上海より、ポリクローナルで用いた方法と **ーナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナ** は、ローリーはあるいは280mmでの吸光度より算出 【0123】乾腹水癌化したマウスから腹水を採取し、 3.000 г р m で 5 分間遠心分離して固形分を除去す ル抗体タイピングキットを用いて行う。タンパク質量

【0124】5.本料明のポリペプチドを生産する組換

以下に、本発明のポリペプチドを特定のヒト組織内で生 高べる。本発明のDNAの完全版c DNAをもとに、必 **虫するための組換えウイルスベクターの関製法についた** 現れ応じて、数ポリペプチドをコードする部分を合む過 出な長さのDNA断片を開製する。 ペシノラズベケゲーの配数形

ウイラスペケケーの語色には、本難引のDNAの配金数 【0 I 2 5】完全長c DNA、あるいは該DNA断片を たにより、超校えウイレスくクターを当成する。 RNA c DNAに相同なcRNA、 粒しくは数ポリペプチドを RNA断片を開催し、それらを、ウイルスペクター内の ルスを造成する。RNA断片は、2本側の他、ウイルス クイアスペクター内のプロホーターの下倒に挿入するの コードする部分を含む適当な長さのDNA断片に相同な プロモーターの下前に挿入することにより、組換えウイ くクゲーの種類に応じた、センス数拾しへはアンチセン ス酸のどちらか一方の1本質を選択する。倒えば、レト ロウイルスペクターの場合は、センス側に相向するRN Aを、センダイウイルスベクターの場合は、逆にアンチ センス鎖に相同なRNAを選択する。

に適合したパッケージング価間に導入する。 ペッケージ ゲドをコードする DNAの少なくとも I つを欠損してい 1.3 等を用いることができる。 パッケージング曲数で補 env暮らだしんプサドだ、フンキセイラススケかーの vpr. vpu. vif. tat. rev. nef400 【0126】 核組換えウイルスハクターや、 敗ハクター ソグ 語音な ケイラスの スッケ ジーング 行 必要な ポリヘン る超級スウイデスペクターの数欠値するボンペプチドか 植給できる細胞は全て用いることができ、例えばヒト臂 **貸由来のHEK293種麭、マウス繊維芽細胞NIH3 恐かる ポンヘンチ ドパつしは、 フトロケノ ラメヘケター** の場合はマウスレトロウイルス由来の888、pol、 場合はHIVウイルス由来のgag、pol、env、 **ポリペプチド、アゲノウイガスペクターの場合はアザノ** ウイルス由来のEIA、EIB等のポリペプチドが、ア デノ配件ウイルスの場合はRep (p5、p19、p4 0)、VP(Спр) 年の共じんどかドだ、カンダイケ イルスの場合はNP、P/C、 L、M、F、H N等のポ リペプチドが発げられる。

的に結合したRNAのパンドを検出する。健常者と患者 【0121】 ウィルスペクターとしては上記スッケージ

ング細胞において組換えウイルスが生産でき、標的細胞 で本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含 有しているものが用いられる。 プラスミドベクターとし (19 95)) , pBabePuro (Nucleic Acids Res., 18, 3587 【0128】プロモーターとしては、ヒト組織中で発現 ば、サイトメガロウイルス (ヒトCMV) の1E(1雪e dlateearly) 遺伝子のプロモーター、S V 4 0 の初期プ ロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチ オネインプロモーター、ヒートショックタンパク質プロ CIANFG (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733-6737 -3596 (1990)) , LL-CG, CL-CG, CS-CC, CLG (Journal of Virology, 72, 8150-8157 (1998)] , pAdex1 (Nucleic る。また、ヒトCMVの18遺伝子のエンハンサーをブ Acids Res., 23, 3816-3821 (1995)] 等が用いられる。 できるものであればいずれも用いることができ、例え モーター、SRaプロモーター等を挙げることができ ロモーターと共に用いてもよい。

【0129】パッケージング笛覧への芭抜れひイガス人 クターの導入法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075号公報] 、リポフェクション法 (Pro c. Natl. Acad. Scl. U SA, 84. 7413 (1987)] 郵を挙 げることができる。

6. 本発明のDNA、ポリペプチドまたは抗体の利用 (1) 本発明のDNAの発現を検出する方法

本発明のDNAを用いて、検体における本発明のDNA のmRNA発現職、骸mRNAの構造変化を検出するこ

とができる。

【0130】検体としては、本発明のDNAの発現変化 から細胞を取得して試験質内の適当な培地中で培養した したもの等から取得したmRNAあるいは全RNA等が が原因となっている疾患を有する患者ならびに健常者よ り取得した組織、血清、唾液等の生体試料、散生体試料 を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として単離 用いられる(以後、該MRNAおよび全RNAを検体由 初代培養細胞試料、または生体試料から取得した組織 米RNAと称する)。

ハイブリダイゼイション法 (Trends In Genetics 7, 31 【0131】検出する方法としては、例えば(1)ノー 在等の方法等が挙げられる。以下、各模出法について群 **ザンブロット街(2)in altuハイブリダイゼイション 法、(3)掟面的PCR法、(4) デファレンシャル・** 4. (1991)}、 (5) DNAチップ法 [Genome Researc h, <u>6</u>, 639, (1996))、 (6) RNase保護アッセイ

ルター等の支持体に転写する。転写後、本発明のDNA ションならびに洗浄を行う。洗浄後、眩プローブと特異 **域体由来RNAをゲル電気泳動で分離後、ナイロンフィ** より間製した慷慨プローブを用いて、ハイブリダイゼイ [0132] ①ノーザンブロット符

より、鮫RNAの発現量ならびに構造の変化を検出する 記なこイブリッドを形成する条件でインキュベーション する。鴟陽性を防ぐためには、ハイブリダイゼイション ならびに洗浄工程をモレキュラー・クローニング第2版 に配載の方法に準じて高ストリンジェントな条件で行う 由来の検体RNAについて駭検出結果を比較することに プローブと検体由来RNA中の目的とするmRNAが安 ことができる。ハイブリダイゼイションを行う際には、 ことが望ましい。 【0133】ノーザンブロット法に用いる協観プローブ を分析することで、飯mRNAの構造変化を知ることが リゴタクレオチドに取り込ませることで翻製できる。標 を反映することから、結合した梛劔プローブの観を定置 本発明のDNAあるいは該DNAの配列から設計したオ 酸プロープのmRNAへの結合量は胶mRNAの発現量 る。また、慷慨プローブが結合するフィルター上の部位 ン、ランダム・ブライミングまたはキナージング)によ り放射性同位体、ピオチン、蛍光萬、化学発光基等を、 することで鮫mRNAの発現量を定置することができ は、例えば、公知の方法(ニック・トランスレーショ

ット切片として単離して得られた検体、および①配載の **洗浄の工程を行う。 洗浄後、①と同様の方法により数プ** ロープと特異的に結合したmRNAの発現量を検出する 偽原性を防ぐためには、ハイブリダイゼイションならび に洗浄工程をカレント・プロトコールズ・イン・モレキ 生体から取得した組織をパラフィンあるいはクリオスタ 懐殿プローブを用いてハイブリダイゼイションならびに ュラー・パイオロジー等に配載されている方法に準じて ことができる。In situハイブリダイゼイション缶で、 【0134】 ②In situハイブリダイゼイション法 高ストリンジェントな条件で行うことが望ましい。

プライマー、および逆転写酵素を用い、c DNAを合成 検体由来RNA、オリゴdTプライマーまたはランダム することに基づいた方法を用いることにより目的とする RNAを検出することができる(以後、眩cDNAを検 体由来c DNAと称する)。 複体由来RNAがmRNA の場合は、上記①のいずれのプライマーも用いることが できるが、眩検体由来RNAが全RNAである場合は、 オリゴdTプライマーを用いることが必要である。

[0135] @定量的PCR法

可能である。また、核増幅DNA断片をゲル電気泳動に 【0136】定量的PCR法では、後体由来cDNAを テンプレートとし本発明のDNAが有する塩基配列に基 特定のMRNA由来のDNA断片が増幅される。 岐増幅 DNA断片の鼠は骸mRNAの発現鼠を反映することか 5、アクチンやG 3 P D H (glyceraldehyde 3-phosphat e dehydrogenase)等をコードするDNAを内部コントロ 一ルとして聞くことで核mRNAの聞を定聞することが **力を吸針したプライマーを用いてPCRを行うことで、**

ともできる。本検出法では、標的配列を特異的にかつ効 **単的に増幅する適当なプライマーを用いることが領まし** マー内の結合を起こさず、アニーリング組度で標的cD NAと特異的に結合して、変性条件で標的cDNAから はずれる等の条件に基づき設計することができる。増加 DNA断片の定量は増幅産物が指数関数的に増加してい るPCR反応の内に行うことが必要である。このような PCR反応は、各反応ごとに生産される核増幅DNA断 より分離することで、鮫mRNAの構造の変化を知るこ い。適当なプライマーは、プライマー間の結合やプライ 片を回収してゲル電気泳動で定置分析することで知るこ 【0131】④ヂファレンシャル・ハイブリダイゼイシ ョン缶およびDNAチップ符

あるいはスライドガラスやシリコン等の基盤に対してハ イブリダイゼイションなちびに洗剤を行う。洗剤後、本 フィルターあるいは基盤上にアクチンやG3PDH等の ③に記載された方法で開製した技体由来 c D N A をプロ 発明のDNAと特異的に結合した。DNA量を測定する ことにより較c DNA由来のmRNAの発現量の変動を 被出することができる。 デファフンシャル・ハイブリダ イゼイション法 およびDNAチップ 法のいずれの方法も 内部コントロールを固定化することで、対照検体と切的 検体の間での核mRNAの発現の違いを正確に検出する ことができる。また対照検体と傾的検体由来のRNAを もとにそれぞれ異なる慷慨dNTPを用いて標識cDN A 合成を行い、 1 枚のフィルターあるいは 1 枚の基盤に せることで正確な鮫mRNAの発現ದの定量を行うこと ープとして、本発明のDNAを固定化させたフィルター II りの弦観 c D N A プローンや回写 にく イソリダイズお

8

メラーゼを用いたin vitroの転写系により標識した r N 5。 乾標撒アンチセンスRNAを、検体由来RNAと結 ロモーター等のプロモーター配列を結合し、RNAポリ 後、RNaseで消化し、消化から保護されたRNA断 片をゲル電気泳動によりパンドを形成させ検出する。得 られたパンドを定置することで、上記爆酷アンチセンス RNAと結合するmRNAの発現塩を定置することがで 合させて、RNA-RNAハイブリッドを形成させた TPを用いて、懐難したアンチセンスRNAを合成す 本発明のDNAの3、幅にT1プロモーター、 【0138】⑤RNase保護アッセイ法

【0139】尚、①~⑤のいずれかに配載した方法に用 いられるDNAとしては、例えば配列番号6~10のい ずれかで丧される塩基配列を有するDNAもしくはそれ らから得られるDNA断片等が挙げられる。また、当診 トピー、喘息、花粉症、気道過数、自己免疫疾患、移植 方法による検出に供する検体としては、アレルギー、プ 片対宿主疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、

原内、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、ララ血 性心不全、外傷性脳損傷、炎症性関疫困等の感染や炎症 ンパ間、成人下細胞白血液、斑粒腫瘍等の異常な細胞増 禁粒芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、エイズ等の へ釈母、アラシスイヤー氏、パーキソンン伝体の存為値 を伴う疾患、パーキットリンパ腫、ホジキン病、各種リ 殖を伴う疾患、関節リウマチ、変形性関節炎等の異常な ウイルス性疾患、幼血性脳疾用の神経細胞の障害に易力 語の音音に起いく疾患、動脈硬化・耳状を等の中消筋質 間の質用な分化増殖を伴う疾患、多臓器不全、全身性炎 健反応候時(SIRS:systemic inflammatory resp onse syndrome)、成人學吸轉過症候群(ARDS:adu エンドトサンソショック、改由値、複生物感味、優任B 型肝炎、慢性C型肝炎、インスリン依存性・非依存性糖 れ、当該検出方法により本発明のDNAの発現を検出す 【0 I 4 0】 (2) 本発明のDNAの疫間を検出する方 Itrespiratory distress syndrome)等の疾患が挙げら ることで、上配俠用の砂断に利用することができる。

以下、被終者における本発明のDNAの変異の有無を検 出する方法について述べる。被験者における数DNAの **欧賢は本発明のDNAと下配方法により直接比較するこ** とにより検出することができる。被験者から、組織、値 消、唾液等のヒト生体試料あるいは、較生体試料から樹 立した初代倍費細胞由来の試料を集め、核生体試料ある いは核初代培養細胞由来試料中からDNAを抽出する **酸試料由来のmRNAより常法によりcDNAを取** る)。 飲食体由来DNAまたは c DNAを飼型とし、本 発明の DNAがなする協善配列に基づを設計したプライ マーを用いてPCR法等によりDNAを増幅する。得ら (以下、 鼓DNAを検体由来DNAと称する)。 また 修する(以下、鮫cDNAを機体由来c DNAと称す れた物価DNAを試料DNAとして用いる。

[Trends Genet., 7, 5 (1991)] 、〇一本登コンフォメ る方法として、野生型対立遺伝子を有するDNA側と変 3)]、 (Dミスマッチの化学的切断法 (CCN, chemical cl 【OI41】増加DNAに底質があるかどうかを検出す 買対立遺伝子を打する DNA 鎖とのハイブリダイズによ り形成されるヘテロ二本鎖を検出する方法を用いること 的切断法 (Nature Genetics, 9, 103-104 (1996))、⑤ かできる。ヘテロニ本観を検出する方法には、①ポリア (1996), Tom Strachan and Andre w P. Rend (B10S Sci entific Publishers Li mited)]、④ミスマッチの酵素 庭性ゲル電気法動法(Mutat. Res., 288, 103-112 (199 (Genomics, 20, 1-4 (1994)) 等の方法 クリルアミドゲル電気泳動によるヘテロニ本鎖検出法 eavage of mismatches) (Human Notecular Genetics 3)] ⑥タンパク質短縮試験 (protein truncation tes —ション多型解析法 (Genomics, 18, 325-332 (199 が挙げられる。以下、上配方法について説明する。

【0142】 ①ポリアクリルアミドゲル電気泳動による

トに、核DNAを配列番号6~10のいずれかに配載の の均幅 DNA断片による 2本鎖形成処理を構法により行 塩基配列に基力を設計したプライマーにより、200b は、庭園を持たないホモ二本鎖よりも移動度が遠く、そ pよりも小さいDNA断片として増幅する。本発明のD NA および被験者由来の駭増幅DNA断片を用い、各々 れらはホモ二本伽とは別のパンドとして検出することが できる。特製のゲル(Hydro-link,NDEなど)を用いた方 が分離皮はよい。2006pよりも小さい断片の検索な らば、挿入、欠失、ほとんどの1塩基圏換を検出可能で 核体由来DNA あるいは検体由来 c DNAをテンプレー う。処理後、ポリアクリルアミドゲル電気決動を行う。 ある。ヘテロニ本鎖解析は、次に述べる一本鎖コンフォ メーション多型解析と組み合わせた1枚のゲルで行うこ 数DNAの変異によりヘテロニ本観が形成された場合 とが留ましい。

一本銀コンフォメーション多型解析(S S C P 解析: s1 では、機体由来DNAあるいは機体由来CDNAをテン プレートに、配列番号6~10のいずれかに記載の協議 配列に基づき設計したプライマーにより、200bpよ りも小さい断片として増幅した駁DNAを変性後、未変 性ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動する。DNA増 幅を行う際にプライマーを放射性同位体あるいは蛍光色 素で慎酷し、乾標礎を指揮とするか、または未爆戯の増 幅産物を電気映動後、銀染色することにより、増幅した **核DNAをパンドとして検出することができる。本発明** のDNA由来の指向DNA断片と、被戦者由来のものとを同時 [0143] ②一本観コンフォメーション多型解析法 ngle strand conformation polymorphism analys is)

に電気泳動することにより、変異を持った断片を移動度

の違いから検出できる。

ミスマッチの化学的切断法(CCM法)では、検体由来 DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートに、核 DNAを配列番号6~10のいずれかに記載の塩基配列 CCM形は最も感覚の角に被出浴の一つであり、キロ人 本発明のDNAに放射性同位体あるいは蛍光色素をとり 込ませた側礁DNAとハイブリダイズさせ、四酸化オス ミウムで処理することでミスマッチしている場所のDN Aの一方の餓を切断させ変異を検出することができる。 に基づき設計したプライマーで増編したDNA断片を、 [0144] ③ミスマッチの化学的切断法 一スの長さの検体にも適応できる。

上記四酸化 オスミウムの代わりに エイファージリゾルベ - スとエンドヌクレアーゼV 1 I のような細胞内でミス マッチの修復に関与する酵類とRNaseAと組み合わ せることで、酵素的にミスマッチを切断することもでき [0145] ④ミスマッチの酵素的切断法

マーで増幅したDNA断片を化学的変性剤の濃度勾配や 合とない場合では増幅したDNAのゲル内での移動度が 変性ゲル電気泳動法 (denaturing gradient gel electr は検体由来c DNAをテンプレートに、配列番号6~1 0のいずれかに配載の塩基配列に基づき設計したプライ 個度勾配を有するゲルを用いて電気泳動する。 増幅した し、変性後は移動しなくなる。眩DNAに変異がある場 異なることから、変異の存在を検出することが可能であ 5. 検出態度を上げるにはそれぞれのプライマーにポリ ophoresis:DGGE法)では、検体由来DNAおるい DNA断片はゲル内を一本鎖に変性する位置まで移動 (G:C) 端末を付けるとよい。

【0146】⑤ タンパク質短縮試験 (protein trunca tion te st: P丁丁法)

フト突然変異、スプライス部位突然変異、ナンセンス突 有するDNAの5.末端にT1プロモーター配列と真核 数賦製によりポリペプチドの欠損を生み出すフレームシ は、配列番号6~10のいずれかに喪された塩基配列を し、眩ブライマーを用いて検体由来RNAより逆転写P CR (RT-PCR) 法でcDNAを作成する。 骸cD NAを用い、In vitro転写、朝职を行うと、ポリペプチ ドが生産される。核ポリペプチドをゲルに決動して、核 ペプチドに欠損がある場合は、完全長ポリペプチドより ポリペプチドの泳動位置が完全長ポリペプチドに相当す る位置にあれば欠損を生み出す変異は存在せず、骸ポリ 短い位置に該ポリペプチドは決動され、 核位置より欠損 然変異を特異的に検出することができる。PTT法で 生物翻駅開始配列をつないだ特殊なプライマーを設計 の程度を知ることができる。

本発明のDNAが有する塩基配列に基づいて設計したプ ライマーを用い、常依により変異を有する機体由来DN り、検体由来DNAあるいは検体由来CDNAが特定の Aならびに検体由来 c D N A の塩基配列を決定すること が可能である。決定された塩基配列を解析することによ 疾患を有する被験者の場合には、眩疾患の原因となる変 【0147】上記の方法で変異が検出された場合には、 異を特定できる。以後、眩変異を検出することにより、 疾患の診断に利用することが出来る。

【0148】上配方法により検出されるDNAのコード 近、数DNA中のイントロンおよび関節配列のような非 コード領域を検査することによって検出し得る。非コー ド領域中の変異に起因する疾患は、上記に配載した方法 に従い対照検体と比較した場合の、疾患患者における異 領域における密異以外の変異の検出には、核DNAの付 塔なサイズの、または異常な生産量のm R N A を検出す ることで確認することができる。

1 0のいずれかに記載の塩基配列を育するDNAをハイ 【0149】このようにして非コード領域における変異 の存在が示唆された該DNAについては、配列番号6~

る変異は上述のいずれかの方法に準じて探索することが り、クローン化することができる。非コード領域におけ ブリダイゼイションのプローフとして用いることによ

時間2001-352986

(55)

Genetics Linkage. The John Hop kins University Pre ことができる。上配変異を検出する方法で診断可能な被 トリンパ園、ホジキン病、各種リンパ園、成人下細胞白 ル・ヌクレオチド・ポリモルフィズム)として同姓する 気道過敏、自己免疫疾患、移植片対宿主疾患等の異常な 病、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、外傷性脳情 傷、炎症性調疾用等の感染や炎症を伴う疾患、パーキッ e)、成人呼吸病迫症候群(ARDS:adult respirato 【0150】見い出された変異は、Handbook of Human 血病、眼性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、関節リ ウマチ、変形性関節炎等の異常な様様芽細胞や瀋陽組織 の活性化を伴う疾患、エイズ等のウイルス性疾患、歳血 **柱脳疾患の神経細胞の障害に暴力へ疾患、 アルッパイル** 思、動脈眼化・再狭衛などの甲番節苗間の異常な分化物 頒を伴う疾患、多臓器不全、全身性炎症反応症候群(S ss. Baltimore (1994) に配載された方法に従い統計処 理を行うことで、疾想との連鎖があるSNPs(シング ク、敗血症、微生物感染、便性B型肝炎、慢性C型肝炎、 インスリン依存性・非依存性糖尿病、糸球体腎炎、乾 数数としたは、アフルギー、アトパー、 軸郎、 右形供 免疫細胞の活性化を伴う疾患、エンドトキシンショッ 一般、パーキンンン病等の神経細胞の障害に魅力へ依 IRS: systemic inflammatory response syndrom

ry distress syndrome)等のいずれかの疾患を有する台 【0151】(3) 本発明のDNA またはオリゴヌクレ を挙げることができる。

オチドを用いて本発明のポリペプチドをコードするDN

アンチセンスRNA/DNA技術(パイオサイエンスと 1), Biotechnology, 9, 358 (1992), Trends in Biotec インダストリー, 50.322 (1992)、化学, 46, 681 (199 プル・ヘリックス技術(Trends in Biotechnology,10. 本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写または 朝散を抑制することができる。例えば、本発明のDNA またはオリゴヌクレオチドを、本発明のポリペプチドを 発現できる系 (生体を含む) に共存させ、敗ポリペプチ inology, 10, 87 (1992) . Trends in Biotechnology. 10. 152 (1992)、細胞工学、16. 1463 (1997))、トリ 132 (1992)) 等により、本発明のDNAを利用して、 Aの転写または翻訳を抑制する方法

11、花粉虚、気道過敏、自己免疫疾患、移植片对宿主疾 世春の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、エンドトキ シシショック、敗血症、衛生物感染、便性B型肝炎、便 性C型肝炎、インスリン依存性・非依存性糖尿病、糸球 体腎炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、ウラ血性心不全、 【0152】 核抑制方法は、アレルギー、アトピー、 ドの発現を転写、翻訳アベルで抑制できる。

與群(SIRS:systemic in flammatory response sy **釈題、関節リウマチ、既形性関節炎等の異常な複雑学組 数や滑削組織の活性化を伴う疾患、エイズ等のウイルス** 成人工細胞白血向、現性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う ドをコードするDNAの底質が原因となっている疾患の アラシスイトー伝、スーキソンソ氏体の苔類価質の幕軸 に終むく疾患、動脈隠化・再味を移の平神節細胞の異常 な分化増殖を伴う疾患、多臓器不全、全身性炎症反応症 ndrome)、成人呼吸轉迫症候群(ARDS:adult resp 性疾患、虚血性脳疾患の神経細胞の障害に基力く疾患、 Iratory distress syndrome) 等、本籍男のポリペプチ 外傷性脳頂傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾 邸、パーキットリンパ間、ホジキン僚、名信リンパ間、 治療または予防に利用することができる。

【0153】(4)本発明のDNAまたはオリゴヌクレ オチドを用いて本発明のポリペプチドをコードするDN Aのプロモーター領域および転写制御領域を取得する方

して用い、公知の方法(モレキュラー・クローニング類 のポリペプチドをコードする DNA のプロモーター領域 以下の方法で、ラットあるいはヒト由来のものを取 本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドをプローブと および低等制御領域を取得することが可能である。例え 2版、点点大学因科学即名所制造即究的值,所描配工学 収録プロトコール,券間社(1993年))により、本発明 何することができる。

【0154】ラットあるいはヒトの細胞や組織から単離 **ラリーに対して、本発明のDNAまたはオリゴヌクレオ** て、プラークハイブリダイゼーション等の方法でスクリ た、ほられたゲノム DNAの塩基配列と c DNAの塩基 した染色体DNAを用いて作製したゲノムDNAライブ 一二ングする。 肢スクリーニングにより、ハイブリダイ ズするゲノム DNAを取得する。 核DNAよりプロモー 配列を比較することによりエキソン/イントロン構造を チド (粉にc DNAの5 個の部分) をプローブとし ター領域および転写制御領域を得ることができる。ま 明らかにすることができる。

割留質しないできることができる。 プロホーター包装と しては、哺乳動物細胞において本発明のボリペプチドを 法に利用することができる他、 該DNAの転写の制御機 【0155】尚、同様の方法を用いて、他の非ヒトほ乳 動物においても数DNAのプロモーター領域および転車 れ、転写制御領域としては、本発明のボリペプチドをコ ードする DNAの基本転写を指強するエンパンサー配列 および展開するサイレンサー配列等を合む領域が挙げら れる。倒れば、ヒトの中値で、水気明のボリベプチドを コードするDNAの転写に関与するプロモーター領域お よび転写制図領域を挙げることができる。得られたプロ モーターおよび転写制御領域は後述のスクリーニング方 コードするDNAの基本転母に関与する領域が挙げら

備を解析するために有用である。

DNAを用いたスクリーニングにより、該DNAの転写 【0156】 (5) 本発明のポリペプチドをコードする を制御する医薬を取得する方法

物質をスクリーニングすることができる。核DNAのm **問弯由来の細胞株に種々の被験化合物を添加し、本発明** とで餃DNAの転写もしくは翻訳を抑制または促過する RNAの発現の増減は、上配したPCR法、ノーザンプ のDNAを用いて、mRNAの発現の増減を検定するこ ロット法、RNase保護アッセイ法により検出でき 【0157】 煩 苔由来細胞株に種々の被験化合物を舐加 し、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用 いて、散ポリペプチドの発現の情域を検定することで骸 DNAの転写もしくは翻訳を促進する物質をスクリーニ ングすることができる。眩ボリペプチドの発現の増減

法)、放射性物質傷觀免疫抗体法(RIA)、免疫組織 は、上配した蛍光抗体法、酵素免疫測定法(ELISA 染色法、免疫細胞染色法等の免疫組織化学染色法(AB C法、CSA法等)、ウェスタンプロッティング法、ド ットプロッティング法、免疫抗降法、サンドイッチEL ISA法により検出できる。

【0158】また、本発明のポリペプチドをコードする クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CA として連結したレポータープラスミドを構築し、適当な 細胞宿主に導入して形質転換体を得た後、その形質転換 体に種々の被験物質を添加し、レポーター遺伝子の発現 コードするDNAの発現を転写レベルで制御する医薬を の地域を解析することにより、本発明のポリペプチドを T) 遺伝子やルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子 DNAのプロモータ領域および転写制御領域の下流に、 スクリーニングすることができる。

【0159】(6) 本発明のポリペプチドを用いたスク リーニング方法により本発明のポリペプチドに作用する 医薬を取得する方法。

る医薬をスクリーニングすることができる。また、精製 本発明のボリペプチドあるでは数ボリペプチドの部分へ プチドを発現した形質転換体と種々の破験物質とを共存 させ、眩形質転換体におけるNF-xBの活性化の変動 チドも眩ポリペプチドに特異的に作用する医薬のスクリ を解析することにより、本発明のポリペプチドに作用す した数ポリペプチドあるいは数ポリペプチドの部分ペプ **一ニングに利用することができる。 核スクリーニングに** よって待られた物質は、本発品のDNA およびポリヘブ チドが関与した疾患の治療のための医薬として有用であ 【0160】以下、2種のスクリーニング法について脱

本発明のポリヘプチドあるでは数ポリヘプチドの部分へ

スクリーにンが符(1)

と被験物質とを水性媒体中で共存させる。共存後、上配 る。形質転換していない宿主の微生物、動物細胞、また は昆虫細胞を対照群として比較し、骸形質転換体におけ るNFー×Bの活性化の程度を変動させる被験物質を選 た、眩探採用形質転換体に特異的に結合する化合物ある いはポリペプチドの、酸探索用形質転換体に対する結合 閥、または昆虫細胞(以後探索用形質転換体と称する) プチドを生産するように形質転換した微生物、動物細 2. に配載の方法に準じてNFー×Bの活性を測定す 択することで目的の物質を取得することができる。ま を阻害することを指標にして、上配と同様の方法によ り、傑的化合物を競合スクリーニングすることができ 【0161】精製した本発明のポリペプチドまたは眩ボ リペプチドの一部を構成するポリペプチドは、骸ポリペ プチドに特異的に結合する概的化合物を選択するのに用 いることができる。梛的化合物を定置するには、本発明 プチドあるいは散ポリペプチドのポリペプチドに結合す のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて上配の 免疫学的方法により行うことができる。また、核ポリペ る標的化合物の結合を阻害することを指標に、標的化合 物を観台スクリーニングすることができる。 【0162】スクリーニング法(2)

スチックピンまたはある種の固体支持体上で高密度に合 り、本発明のポリペプチドにより転写制御を受ける遺伝 成し、鮫ペプチドに選択的に結合する化合物あるいはポ リペプチドを効率的にスクリーニングすることができる (WO84/03564)。 尚、本発明のポリペプチドを発現する 形質転換体を用いて、遺伝子の発現を解析することによ 数ポリペプチドの一部を構成するペプチドを多数、 子をスクリーニングすることができる。

【0163】(7) 本発明のDNA、または核DNAと 本発明のDNA、または核DNAと相同な配列からなる RNAを含有するウイルスペクターを用いた遺伝子治療 よび遺伝子治療剤に用いる基剤を調合することにより製 水、塩化ナトリウムまたは塩化ナトリウムと無機塩との 4)]。遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤 **混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキス** トラン、グルコース等の観浴後、グリシン、アルギニン 等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とゲルコース ズ油等の植物油又はフシチンもしくは非イオン界田活性 # を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤と 剤は、上記の5.で作製した組換えウイルスペクターお 俗族との混合溶液等があげられる。また常法に従い、こ れらの基剤に浸透圧調整剤、pH酮整剤、ゴマ油、ダイ に用いる基剤であればどのようなものでもよく、蒸留 **散液として注射剤を腐製してもよい。これらの注射剤** 相同な配列からなるRNAを含有する遺伝子治療剤 告することができる (Nat ure Genet., g. 42 (199 **引等の界面活性刻等の助刻を用いて、溶液、懸濁液、**

処理をした上記の基剤に遺伝子治療の直前に溶解して治 寮に使用することができる。本発明の遺伝子治療剤の投 **夜体の場合はそのままで、個体の場合は必要により減菌** して閻製することもできる。本発明の遺伝子治療剤は、 与方法としては、思着の治療部位に吸収されるように、 局所的に投与する方法をあげることができる。

時間2001-352986

(54)

ウイルス・ヘキソン・タンパク質に特異的なポリリジン 作製し、得られたコンプレックスをアデノウイルスペクターに結合させることにより、ウイルスペクターを調製 することができる。 数ウイルスペクターは安定に値的値 細胞内で分解され効率的にDNAを発現させることがで - コンジュゲート抗体と組み合わせてコンプレックスを 胞に到達し、エンドソームにより細胞内に取り込まれ、 【0164】適当なサイズの本発明のDNAを、

【0165】 (一) 鎖RNAウイルスであるセンダイウ イルスをベースにしたウイルスベクターも開発されてお 目的としてKRGF-1遺伝子を組み込んだセンダイウ り(特爾平9-517213、特爾平9-517214)、遺伝子治療を 非ウイルス遺伝子移入法によっても病巣に輸送すること イルスペクターを作製することができる。鮫DNAは、

には、リン酸カルシウム共优法(Virology、<u>52</u>、456-46 7(1973):Science、<u>209</u>、1414-1422(1980))、マイク 1<u>7</u>, 7380-7384 (1980) : Cell, <u>27</u>, 223-231 (1981) : N ature, <u>294</u>, 92-94 (1981)] 、リボソームを介した課題 合-介在移入法 (Proc. Natl. Acad. Scl. USA. <u>84</u>, 74 【0166】当該分野で公知の非ウイルス遺伝子移入法 1288 (1990); Circulation, <u>83</u>, 2007-2011 (1992)] あるいは直接DNA取り込みおよび受容体-媒介DNA移 入法 (Science, <u>247</u>, 1465-1468 (1990); J. Biol. Che Gene T her., 3.267-275 (1992); Science, 249, 1285-88. 4255-4259 ロインジェクション法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, m., 266, 14338-14342 (1991); Proc. Natl. Acad. Sc 1. USA, 87, 3655-3659 (1991); J. Biol. Ches., 26 4.16985-16987 (1989) ; BioTechniques, 11, 474-485 54 (1991) : Hum . Gene Ther., 3, 147-154(1991)] 再 77. 5399-5403 1980) ; Proc. Natl. Acad. Scl. USA. (1991) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3410-3414 13-7417 (1987); Biochemistry, 28, 9508-9514 (198 9); J. Biol. Chem., 264, 12126-12129 (1989); Hum. 7 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1991) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1990) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, を挙げることができる。

【0167】リポソームを介した関聯合一介在移入法で とにより、当該組織の局所的な遺伝子の取り込みおよび 発現が可能であることが腫瘍に関する研究において報告 はリポソーム阿製物を棚的とする組織に直接投与するこ されている (Hum. Gene Ther., 3, 399-410 (1992))。 特開2001-352986

したがって 阿様の効果が本発明の DNA およびボリペプ チドが関与する供用角質でも関防される。 DNAを角巣 に直接ターゲッティングするには、直接DNA取り込み **う。リガンドは、傾的細胞または組織の細胞被断上の対 応するリガンド投容体の存在に基づいて選択する。当動 シンパク質コンプレックスの内在化が起こる傾的組織に** 指向しほる。DNAの細胞内破壊を防止するために、ア デノウイルスを同時感染させて、エンドソーム機能を崩 (通常、共存的に関環したスーパーコイル化プラスミド リガンド・DNAコンジュゲートは、原因により、自動 に血接注射することができ、受容体結合およびDNA・ 技術が好ましい。受容体・媒介DNA移入は、例えば、 ポリリジンを介して、ポリペプチドリガンドにDNA の形態をとる)をコンジュゲートすることによって行 観させることもできる。

【0168】(8)本発明の抗体を用いて本発明のポリ 抗原抗体反応を行わせることにより、本難母のポリペン チドまたは数ポリペプチドを含む組織を免疫学的に検出 一、唱剧、花粉盘、気温透散、自己免疫疾患、移植片对 の感染や技症を伴う疾患、パーキットリンパ腫、ホジキ ン伝、各種リンパ腫、成人工価間白血疫、関性腫瘍等の 異常な細胞増殖を伴う疾患、慢性関節リウマチ、肺線維 即、エイズ等のウイルス性疾患、虚血性脳疾患の神経細 市主疾困等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、エン 痛風、各種脳脊髄炎、ラっ血性心不全、炎症性間疾患等 智の響動に越力へ依倒、アルシハイヤー依、パーキソン ン伝承の神経質質の自動に基力へ依拠、動脈硬化・再狭 **登等の平滑筋細胞の肌帯な分化増強を伴う疾患、多腱器** 不全、会身性炎症反応症候群(SIRS:systemic inf 4、本語母のポリペプチドをコードするDNAの復興が また、数検出方法は、ポリペプチドの定量にも用いられ 本野明のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用い、 ドトキシンショック、吸血症、微生物感味、便性8型肝 玖、慢性C型肝炎、インスリン依存性・非依存性糖尿 点、糸球体腎炎、外傷性脳損傷、変形性関節炎、乾鬱、 lammantory response syndrome)、成人學吸傳通像群 原因となっている疾患の診断に利用することができる。 することがたまる。数数出俗は、アフゲボー、アトガ 使等の異常な数様が細胞や骨膜組織の活性化を伴う疾 (ARDS : adult respiratory distress syndrome) スプチドを免疫学的に検出する方法

4、<u></u>世光抗体法、**耐索免疫**微定法 (ELISA法)、放 對性物質標識免疫抗体法(RIA)、免疫組織染色法や シティング法、免疫社局法、サンドイッチELISA注 【0169】免疫学的に検出および定価する方法として R疫苗間製色は等の免疫組織化学染色法(ABC法)C S A 弦響)、ウェスタンプロッティング弦、ドットプロ (ボクローン抗体攻撃をニュアル (関較社サイエンティ フィック)(1987)、税生化学実験調路5.免疫生化学研

[0170] 蛍光抗体法とは、本発明のポリペプチドを 問題内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞ある **本の世光物質で少くがしただマウス!BCだ存めるでは** いは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、 さらにフルオレシン・インチオシアネート (FITC) その断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメー (東京化学同人) (1986)] 等が挙げられる。 ターで気流する方法である。 【0171】酵素免疫測定法 (ELISA法) とは、酸 物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の 断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する 抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ピオチン等 の酵素慷慨等を施した抗マウス!g G抗体あるいは結合 ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した酸性

ノーションカウンター等で包定する方法である。 免疫組 は、数ポリペプチドを簡脳内あるでは簡脳外に発展した 微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発 明の抗体を反応させ、さらに放射機模職を施した抗マウ ス1gG杭体あるいはその断片を反応させた役、シンチ **間染色法、免疫組織染色法とは、数ポリペプチドを細胞** 内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは **恩虫細胞または組織に、核ポリペプチドを特異的に配職** する抗体を反応させ、さらにFITC等の歯光物質、く **ルオキシダー七、パオチン等の群戦機関を協した抗マウ** スIBC抗体あるいはその断片を反応させた役、顧微的 【0172】放射性物質攝觀免疫抗体法 (RIA) と を用いて観察する方法である。

ペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動 ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Antibodies-A Labor ロセルロース瞬にプロッティングし、核膜に本発明の核 ポリペプチドを特異的に認識する抗体を反応させ、さら **にFITC鉢の紐光を置、 ペラギキツダーお、 パギチン** 等の酵素御髄を施した抗マウス 1 g G 抗体あるいはその 【0113】 ウェスタンプロッティング法とは、駁ポリ 物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液をSDSatory Manual. Cold Springflarbor Laboratory, (198 8)] で分画した後、枝ゲルをPVDF関あるいはニト 断片を反応させた後、確認する方法である。

チドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細 **一ス膜にブロッティングし、鼓膜に本発明の抗体を反応** 【0114】ドットブロッティング訊とは、 数ポリペン **酌あるいは 昆虫細胞または組織の抽出液をニトロセルロ** ゼ、ピオチン等の酵素慷慨を施した抗マウス!g C 抗体 あるいは結合断片を反応させた後、確認する方法であ させ、さのにFITCQO組米物質、ペプチキシダー

【0175】免疫沈降法とは、本発明のポリペプチドを 細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞ある いは民虫細胞または組織の抽出液を酸ポリペプチドを特

異的に配置する抗体と反応させた後、プロテインG-セ ファロース等イムノグロブリンに特異的な結合能を有す る担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる方法であ

トなが、花存取種プラードに、殻がつんプチドが質問左 【0176】サンドイッチELISA法とは、本発明の ポリペプチドを特異的に配戴する抗体で、抗原配戯的位 の異なる2種類の抗体のうち、あらかじめ一方の抗体を プレートに吸着させ、もゥー方の抗体をFITの等の蛍 光物質、ヘルギキシダーゼ、アメチン等の解素で核製し あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは異 虫細胞または組織の抽出液を反応させた後、爆離した抗 体を反応させ、機動物質に応じた反応を行う方法であ

【0177】(9) 本発明のポリペプチドを特異的に配 載する抗体を用いて疾患を診断する方法

ヒト生体試料ならびヒト初代培養組留での、販ポリペプ チドの発現量の変化ならびに発現しているポリペプチド の構造変化を固定することは、将来、疾患を発症する危 数ポリペプチドの発現量や構造変化を検出して診断する 方法としては、上配した、蛍光抗体法、酵素免疫拠定法 (ELISA法)、放射性物質振觀免疫抗体法(RIA)、免疫組織染色法や免疫細胞染色法等の免疫組織化 学験色法(ABC法、CSA法等)、ウェスタンプロッ ティングは、ドットプロッティングは、免疫は降は、サ 険性や既に発症した疾患の原因を知る上で有用である。 ンドイッチELISA弦等が捧げられる。

自己免疫疾患、移植片対宿主疾患等の異常な免疫細胞の 問題抽出液が用いられる。また、生体試料から取得した 微生物感染、慢性B型肝炎、慢性C型肝炎、インスリン依 トリンパ瞳、ホジキン病、各種リンパ腫、成人工価配白 **性脳疾患の神経細胞の障害に基づく疾患、アルツハイマ** 存性·非依存性糖尿病、糸球体腎炎、外傷性脳損傷、変 形性関節炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不 全、炎症性關疾用等の感染や炎症を伴う疾患、パーキッ 白成、既在閩海等の政治な笛配坦強を伴り疾患、彼在図 節リウマチ、砂糖維供等の異格な糠維が細胞や清陽組織 の活性化を伴う疾患、エイズ等のウイルス性疾患、虚血 我人呼吸轉迫症候群(ARDS∶adult respiratory di するDNAの変異が原因となっている疾患の患者より取 のものあるいは、眩生体試料から取得した細胞ならびに 製脈硬化・再狭窄等の平滑筋細胞の異常な分化増殖 を伴う疾患、多臓器不全、全身性炎症反応症候群(SI **得した組織、血液、血清、尿、便、唾液等の生体試料そ** stress syndrome) 等、本発明のポリペプチドをコード **活性化を伴う疾患、エンドトキシンショック、敗血症、** 【0178】上配方法による診断に供する検体として **は、アフゲギー、アトパー、軸側、花粉館、飲道過数** −低、パーキンンン依律の神師価値の留むに魅力へ依 R S : systemic inflammatory response syndrome)

国権を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として 単離したものを用いることもできる。

法、ウェスタンプロット法、免疫組織染色法等が挙げら れる。免疫学的に定置する方法としては、液相中で本発 **思のポリペプチドカ反 朽する 抗体の シちコプトープが蹴** のポリペプチドと本発明のポリペプチドを配置する抗体 なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA法、125 1等の放射性同位体で傾瞰した本発明 【0180】(10) 本発明のDNAを用いたノックア ロタイタープレートを用いるELISA班・钕光抗体 とを用いるラジオイムノアッセイ法等が挙げられる。 【0179】免疫学的に検出する方法としては、

タ、ウマ、マウス、ニフトリ等の胚性幹細胞(embryonic 等)により不活化または任政の配列と間換した変異クロ 目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒッジ、ヤギ、ブ ドをコードするDNAを公知の相同組換えの手法(例え stem cell)において、駅色体上の本知路のポンペプチ 本発明のDNAを含有してなる超換えベクターを用い、 (3, Nature, 326, 295 (1987), Cell, 51.

ウト非ヒト動物の作製

1)]。 胚性幹細胞の変異クローンを用い、動物の受精卵 ラ法等の手法により、胚性幹細胞クローンと正常細胞か 個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞の染色 の変異を有する個体を得ることができ、さらにその個体 モ個体の中から、本発明のポリペプチドをコードするD らなるキメラ個体を閲製することができる。 このキメラ の掛け合わせにより相同染色体の双方に変異が入ったホ の胚盤胎(blastcyst)への注入キメラ法または集合キメ 体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAに任意 N A の発現が一部または完全に抑制された個体としてノ ーンを作製する (例えば、Nature, 350, 243 (199 ックアウト非ヒト動物を得ることができる。

コードするDNAの任意の位置へ変異を導入することに させることも可能である。また、その発現制的領域への 【0181】また、駅色体上の本発明のポリペプチドを より、ノックアウト非ヒト動物を作製することも可能で ある。例えば発色体上の本発明のポリペプチドをコード するDNAの翻駅倒域中へ協善を開換、欠失、挿入等さ せて変異を導入することにより、その産物の活性を改変 組織特異性等を改変させることも可能である。さらにC r e — I o x P 系との組合せにより、より価値的に発現 る。このような例として、脳のある特定の領域で発現さ れるプロモータを利用して、その領域でのみ目的遺伝子 を欠失させた例 (Cell, 87, 131 7, (1996)] やCre 同様な変異を導入することにより、発現の程度、時期、 時期、発現部位、発現量等を制御することも可能であ を発現するアデノウィルスを用いて、目的の時期に、 器特異的に目的遺伝子を欠失させた例 (Schence, 5335(1997)〕が知られている。

【0182】従って、原色体上の本発明のポリペプチド

(28)

非ヒト動物は、任意の時期、任意の国政または任意の部 をコードするDNAについても、このように任意の時期 位で、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の症 西校をその翻訳領域や発現制御領域になする、ノックア ウト非ヒト動物を作製することができる。 ノックアウト 伏を誘導することができる。このように、本発明のノッ クアウト非ヒト動物は、本発明のポリペプチドに起因す る種々の使用の治療や予防において極めて有用な動物モ や組織で発現を制御できる、または任意の挿入、欠失、 デルとなる。特にその治療薬、予防薬、また機能性食 品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用であ

【0183】 7. 本発明のポリペプサドの疫国導入およ

(1) 本発明のポリペプチドの仮覧導入 び機能改変度異体の選択

コージズ・イン・ホフキュサー・パイギロジー塾に記載 **ゆ入・団換のいかなる方法を用いてもよい。 ポリペプチ** ドの欠失・抑入は、数ポリペプチドをコードするDNA をモレキュサークローニング類 2版やカレント・プロト された方法により当なDNA断片を欠失させる、あるい 数ポリペプチドに整路を導入する方法としては、欠失 は適当なDNA断片を挿入させることにより可能であ

ることができる。増換変異体は、ランダムに変異を導入 する方法として、例えばError Prone PCR花(Trends In 【OI84】例えば、欠失度異体であれば、鼓DNAの 中で適当な同じあるいは異なる劇歴酵素サイトを2個見 出し、鼓DNAを含んだプラスミド等を市販の舷制限酵 敷により消化後、平滑末端であればそのまま、突出末端 リメラーゼにより平滑化し、再連絡させることにより得 ることができる。個人変異体であれば、平滑未備化後に 過当な二本側DNAを押入し、連絡させることにより得 できる。目的の位間に度料を導入する方法として、度料 を有したプライマーを用いたPCR法 (Mutagenesis and S ynthes is of Novel Recombinant Genes Using PCR, PC PRINER A LABORATORY MANUAL, 603 (1994)) あるいはの Blotechnology, 16, 76 (1998)))等を用いることが uikChauge^{Ta} Site-Directed Nutagenesis Kit (STRATACE でおればKlenow Fragment (TaXaRa社製) 毎のDNAボ NE社製)等を用いることができる。

[0185] (2) 本発明のポリペプチドの極能改成效 間体の選択

19ることができる。また、NFー×Bを活住化する刺散 は、殷ポリペプチドおよび骸ポリペプチドの盗員体のそ **こかこかフボーかー笛智言等人つ、根ボンスプチドルウ** レポーター活性を上昇させた変異体を選択することによ り、NF-*B活性化樹館を上昇した樹脂改変変異体を 2.に配載した方法に傳じて、NF-×B 活性化に対す (1) で作製した数ポリペプチドの変異体より、上記 る活性上昇改度を異体の選択が可能である。具体的に

字在下でNF-ĸB活性化を抑制する数ポリペプチドの **虹異体を選択することにより、ドミナントネガティブ変** 3.体を得ることができる。

田間レセプター抗体、抗CD2抗体、抗CD3抗体、抗 【0186】具体的には、販ポリペプチドの整異体をレ CD28杭体、Caイオノフォア)、B細胞マイトジェ ン (抗 I g M 抗体、a n t 1 – C D 4 0) 、ロイコトリ エン、LPS、PMA、寄生体感染、ウイルス感染(H ポーター粗略に導入し、サイトカイン(T N F ー a 、T NF-B, 1L-1a, 1L-1B, 1L-2, L1F IV-1, HTLV-1, HBV, EBV, CMV, H デノウイルス等)、ウイルス癌物(二本観RNA、TB x、HBX、EBNA-2、LMP-146)、DNA股 最物質類、タンパク質合成インヒピター類(例えばシク ロヘキシミド)、無外標、放射線、酸化ストレス等のN FIxBを活性化する刺激を与え、レポーター活性が変 異体を導入していない時よりも低下した数ポリペプチド の変異体を選択することにより、ドミナントネガティブ **等)、T哲智マムトジェン(拉原処徴、フクチン、抗I** SV-1、HHV-6、NDV、センダイウイルス、ア 仮具体を得ることができる。

【0181】尚、梅ちれたドミナントネガティブ変異体 は、炎症広答哲制や題性細胞の増強抑制に応用可能であ り、眩ドミナントネガティブ変異体をコードするDNA は、NFー×Bの活性化を伴う疾患の遺伝子治療に利用 できる可能性がある。以下に実施例をあげて、本発明を 具体的に説明する。ただし、これらの実施例は説明のた めのものであり、本発明の技術的範囲を制限するもので (Dominant Negative mutants:優性機能抑制效與体) はない。

[0188]

【英施例】【英施例1】ヒト大闘およびヒト配助組織由 ヒトの大闘ねよび即防組織より、モレキュラー・クローコング類2版に記載の方法によりmRNAを抽出した。 来完会長c DNAライブラリーの作製

精製した。それぞれのpolyA.RNAよりオリゴキ Aライブラリーを作製した。011go-cap linker (配列番 写!1)および011go dT primer (配列番号12)を用 200, 149-156 (1997)に配載の方法に従って、BAP(B acterial A Ikaline Phosphatase) 処理、TAP(Toba 類一観cDNAの合成とRNAの除去を行った。ほられ プライマー (配列番号14) の2種のプライマーを用い るPCRにより二本鎖cDNAを増加し、Sfilr的 サップ法 (Gene, 138, 171-174 (1994)) によりこDN さらに、オリゴdTセルロースでpolyA·RNAを た類一銭cDNAを鋳型として、5.米雑園のセンスプ **ライマー (配列番号13) と3.米権風のアンチセンス** 所した。PCRは、市版のキット:GeneAmp X い、斑白質核酸酵素,4<u>1</u>,197-201(1996)またはGene, cco Acid Phosphatase) 処理、RNAライゲーション、

5 でで 5 分間熱処理後、9 5 でで 1 分間、5 8 でで 1 分 間および12℃で10分間の反応サイクルを12回繰り 【0189】 Drall に切断したくクターpHE18SFL PCRキット (Perkin Elmer社製) を使用して、9 返し、その後4℃で保持することにより行った。

3 (GeneBank AB009864、発現ベクター, 3392bp) に上配 増幅cDNAを挿入し、cDNAライブラリーを作製し クエンシング試薬 (Dye Terminator Cycle SequencingF S Re ady Reaction Kit, dRhodomine Terminator Cycle Sequencing FS ReadyR eaction KitまたはBigDye Term Inator Cycle Sequencing FS Ready ReactionKit, PE B PRISM 377, PE Blosystems社製)を用いて塩基配列を決 て、c DNAの5 ' 端と3 ' 端の塩基配列を、DNAシー losystems社製)を用い、マニュアルにしたがってシー クエンス反応を行った後、DNAシークエンサー (ABI た。得られたクローンのプラスミドDNA各々につい

りルシフェラーゼ活性が発現制御されるレポーター組制 【0190】 [東施例2] NFー×Bエンハンサーによ 株の部内 1 FN - β中のNF-×B配職配列(配列番号15)を 3回繰り返した人工プロモーターを作製し、ルシフェラ -- ポンボーターくクター (pAGE-1nc:特別中3-22979、 女 数医学, 1, 96-103 (1989))のルシフェラーゼ選 法(810-RAD社製:Gene Pulser™)によって、ヒト背組 閣株293 (Clontech社製) 1.6×10*個に遺伝子導 TNFーa刺散によって、無刺激と比較して670倍と 0)、1 mmol/1 EDTA (エチレンジアミン4 耐性遺伝子を含んでおり、遺伝子導入後は、ハイグロマ よーションC、25U/mlストレブトレイツン)で配 伝子の5.上流域に挿入した(以後、pIF-1ucとよぶ)。 **弊報ナトリケム)」に添飾つ、Hフケトロボフーション** 養、ハイグロマイシンを遺伝子導入の選択マーカーとし 餃プラスミド 4μgを1μg/μ1となるようにTE榎 イシン0.2g/1を際加したRPMI珀地(RPMI1 640 (日本水産社製)、10% 子牛血清、0,05 mmo 1/1-メルカプトエタノール、25 U/ml て安定形質転換株を樹立した。安定形質転換株のうち、 入した。plF-lucは、ハイグロマイシン(Hygromycin) いう高いルシフェラーゼ活性を誘導した株を選択(以 衛液 (10 mmol/1トリスーHCl (pH8.

後、菌体を遠心分離機で回収し、プラスミド酮製キット 【0191】 [実施例3] 293/1F-LUCを用い **典施例1で塩基配列を決定したクローンを、アンピシリ** ン (100 mg/l) を添加した2×YT増増 (Yenst ex tract 10 g/l, Trypton 16 g/l, NaC 5g/l) 2 m 1中、37℃で、16時間、各々振躍培養した。培養 た完全長DNAのNFー×B活性化に対する解析

後、293/IF-LUCとよぶ)し、以下の発現アッセイに

エルプレートに 2 9 3 / I F - L U C 価配を 1 ウエルち m. Packar社製)とルシフェラーゼ活性側定装置 (ARVO **に添付資料の方法で各々プラスミドを開製した。96ウ** 集細胞に、上記プラスミド約0.25μgをそれぞれり t. GIBCO BRL社製)を用いて、極付資料の方法に従って (QIAPrep96 Turbo Winiprep Kit, QIACEN社製)を用い 導入した。31℃で、16時間、CO2インキュペータ 1420 MULTILABEL COUNTER, WALLC社製の を用いて、ル たり20,000個となるように分注し、37℃で、1 6時間、C01インキュベーター中で拍響した。この拍 一中で培養後、ルシフェラーゼ活性測定試薬(LucLite ポフェクション試薬 (LIPOFECT AWINE 2000™ Reagen シフェラーゼ活性を関定した。

(配列番号10の塩基配列を有するDNAクローン)の 3.0倍の活性が確認された。核クローンより、本発明のDNAを各々取得した。 [0192] その結果、COL03279 (配列番号6 ADKA01604 (配列番号8の塩基配列を有するD NAクローン)、ADSU00701 (配列番号の塩 各クローンのプラスミドを導入した場合において、それ の協善配別を有するDNAクローン)、COL0617 ぞれネガティブコントロール (pWE18SFL3を使用) と比 2(配列番号1の塩基配列を有するDNAクローン)、 基配列を有するDNAクローン)、CAS01989 較して12、5倍、6、3倍、4、4倍、2、7倍、

【0193】 [実施例4] 本発明のDNAの各種臓器に おける発現園の検出 COL03279, COL06772, ADKA016 04、ADSU00701の各クローンに配められる本 発明のDNAの各種臓器における発現量の定量を、定法 どの細胞でも何根度発現していると考えられるグリセル アルデヒドー3ーリン酸デヒドロゲナーゼ (glyceralde hyde-3-phosphate dehydrogenase: G 3 P D H) の転耳 産物の定量を同時に行ない、細胞間でのmRNA量が達 いや、サンプル間での逆転与摩索によるm R N A からー 扁桃体、13小椒、14脳緊、15胎児鼠、16胎児腎 (PCR Protocols, Academic Press (1990)等) に従い、 本顔 c DNAへの変換効率に大楚ないことを確認した。 【0194】ヒト賦器由来のmRNA (Clontech社製: **腎髓、8膵臓、9脳下垂体、10小腿、11骨腫、12** 半定量的P C R 法を用い、以下のように行った。また、 1即臂、2脳、3尾状核、4海馬、5無質、6視床、7

21時、22リンパ節、23乳腺、24胎盤、25前立 5子酉) からc D N A 合成キット (SUPERSCRIPI^{TI} Pres mplification System: BRL社製)を用いて、一本館にD を合成し、水で240倍希釈してPCRの鋳型として使 腺、26唾液腺、27骨格筋、28脊髄、29脾臓、3 0四、31精単、32胸腺、33甲状腺、34気管、3 NAを合成した。1μgのmRNAから一本鎖c DNA 臟、17胎児肝臟、18胎児肺、19心臓、20肝臓、

時間2001-352986

配列番号14-人工配列の説明:合成DNA (3.末端側の [0197] 7、COL06772か5の協議配列情報に基づいた配 rase (GeneTaq) と舐付め10×Gene Tag Universal Bu fferおよび2.5 mmol/id N T P M I x t u r eを用 **用した。PCR用プライマーとしては、COL0327** 列番号18 および19、ADKA01604からの塩基 配列情報に基づいた配列番号20および21、ADSU 00701からの協感配列情報に基づいた配列番号22 は、コッパンジーン社数のRecombinant Ing DNA Polyme 0サイクル行った。反応液をアガロースゲル電気泳動法 9からの協議配列信仰に越力いた配列指導 16 ねよび 1 製のサーマル・サイクラーを用いて、9 4 ℃で3 0 秒間、8 0 ℃で 1 分間、7 2 ℃で 2 分間の反応を 2 6 ~ 3 9, COL06772, ADKA01604, ADSU いて、説明像に従って行った。MJRESERCH社 および23に配載の合成DNAを用いた。PCR反応 【0195】箱果を図1~4に示す。COL0327 は、各クローン、各臓器によって強弱の憩はあるもの 007010各クローンに認められる本発明のDNA およびユチジウムプロマイド駅色により解析した。 の、検討した35億全ての顧器で発現していた。

一、喘息、花粉虚、気道過敏、自己免疫疾患、移植片対 宿主疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、エン ドトキシンショック、吸血値、微生物感味、慢性 8 型肝 价、杂球体臂炎、外傷性脳損傷、乾癬、痛風、各種脳脊 相段、うっ血性心不全、炎症性間疾患等の感染や炎症を 伴う疾患、パーキットリンパ腫、ホジキン病、各種リン パ間、成人「稲粒白血体、現性腫瘍等の具体な細胞増殖 を伴う疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節炎等の異常 な様様芽細胞や滑興組織の活性化を伴う疾患、エイズ等 して釈迦、アラシこイトー佐、パーサソンソ仮尊の存施 のウイルス性疾患、適血性脳疾患の神経細胞の障害に基 [発明の効果] 本発明によれば、アレルギー、アトビ 以、慢性C型肝炎、インスリン依存性・非依存性糖尿 [9610]

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. <120> Novel polypeptide SEQUENCE LISTING

<130> H12-0641J5

₽ ÷

c170> Patentin Ver. 2.1

[0199]

<160> 21

<912>

<211> 780

-212> PRI

<213> Homo saptens -400+

Wet Ala Ser Ala Glu Leu Gln Gly Lys Tyr Gln Lys Leu Ala Gln Glu

A、該DNAを用いた遺伝子治療、核ポリペプチドを認 価粒の厚色に越力へ依思、動脈硬化・甲状物等の中域筋 細胞の異常な分化増殖を伴う疾患、多臓器不全、全身性 设使反抗结核群(SIRS:syste mic inflammatory r esponsesyndrome)、成人呼吸的迫症候群(ARDS: a dult respiratory distress syndrome)等の治療薬の探 霖、開発に有用なポリペプチド、骸ポリペプチドをコー ペプチドのドミナントネガティア変異体、およびこれら 置する抗体、眩ボリペプチドの活性上昇改変体、眩ボリ ドするDNA、胶DNAのアンチセンスDNA/RN の利用法を提供することができる。

【配列表フリーテキスト】

配列番号11一人工配列の説明:合成NA(オリゴキャ ップリンカー配列)

配列番号12-人工配列の説明:合成DNA(オリゴdffブ

ライマー配列)

配列番号13-人工配列の説明:合成DNA (5.末端側の センスプライマー配列)

配列番号15-人工配列の説明(転写因子NF-x 結合配 アンチセンスプライマー配列)

配列番号16-人工配列の説明:合成DNA(組織発現分

配列番号17一人工配列の説明:合成DNA 布を検討した合成プライマー配列)

配列番号18一人工配列の説明:合成DNA 配列番号 I 9 一人工配列の説明:合成DNA 配列番号20-人工配列の説明:合成DNA

配列番号21一人工配列の説明:合成DNA 配列番号22一人工配列の説明:合成DNA 配列番号23一人工配列の説明:合成DNA

30

Tyr Ser Lys Leu Arg Ala Cln Asn Cln Val Leu Lys Lys Cly Val Val 52

Asp Giu Gin Ala Asn Ser Ala Aia Leu Lys Giu Gin Leu Lys Net Lys Asp Gin Ser Leu Arg Lys Leu Gin Gin Het Asp Ser Leu Thr Phe

Ma Leu Se r Glu Pro Arg Gly Lys Lys Asn Lys Lys Ser Gly Glu Ser Arg Asn Leu Gin Leu Ala Lys Arg Val Glu Leu Leu Gin Asp Glu Leu

Ser Ser Gin Leu Ser Gin Giu Gin Lys Ser Val Phe Asp Glu Asp Leu Gin Lys Lys 11e Clu Giu Asn Giu Arg Leu His 11e Cin Phe Phe Clu 105

Ala Asp Glu Gln His Lys His Val Glu Ala Glu Leu Arg Ser Arg Leu 125 20

Ala Thr Leu Giu Thr Giu Ala Aia Gin His Gin Aia Val Val Asp Giy Leu Thr Arg Lys Tyr Net Clu Thr IIe Clu Lys Leu Cln Asn Asp Lys 2 155 135 3

Ala Lys Leu Glu Vai Lys Ser Gln Thr Leu Glu Lys Glu Ala Lys Glu

Cys Arg Leu Arg Thr Glu Glu Cys Gln Leu Gln Leu Lys Thr Leu His

Glu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Glu Glu Ser Leu Ser II e lle Asn Glu

Lys Val Pro Phe Asn Asp Thr Lys Tyr Ser Gin Tyr Asn Ala Leu Asn Val Pro Leu His Asn Arg Arg His Gin Leu Lys Wet Arg Asp 11e Ala

Ciy Cin Aia Leu Aia Phe Val Cin Asp Leu Vai Thr Aia Leu Leu Asn

Phe His Thr Tyr Thr Glu Gin Arg lie Gin lie Phe Pro Val Asp Ser Ala lle Asp Thr lle Ser Pro Leu Asn Gln Lys Phe Ser Gln Tyr Leu 280

His Giu Asn Ala Ser Tyr Val Arg Pro Leu Giu Giu Giy Het Leu His Leu Phe Glu Ser lle Thr Glu Asp Thr Val Thr Val Leu Glu Thr Thr 292

Val Lys Leu Lys Thr Phe Ser Glu His Leu Thr Ser Tyr lie Cys Phe Leu Arg Lys 11e Leu Pro Tyr Gin Leu Lys Ser Leu Giu Giu Giu Cys Clu Ser Ser Leu Cys Thr Ser Ala Leu Arg Ala Arg Asn Leu Glu Leu Ser Gin Asp Net Lys Lys Net Thr Ala Val Phe Giu Lys Leu Gin Thr

特開2001-352986

3

Tyr 11e Ata Leu Leu Ata Leu Pro Ser Thr Giu Pro Asp Gly Leu Leu Arg Thr Asn Tyr Ser Ser Vai Leu Thr Asn Vai Gly Aia Aia Leu His 420 430 Cly Phe His Asp Val Wet Lys Asp Ile Ser Lys His Tyr Ser Cin Lys Lew Ata Asan Arg Arg Lie Lew Lew Ser Ser Thr Giu Ser Arg Ciu Ciy 545 550 550 555 560 Lew Ata Gin Cin Vai Gin Gin Ser Lew Giu Lya Lie Ser Lya Lew Giu 565 570 570 575 Thr Ala Giy Gin Asp Giu Ale Thr Ala Lys Ala Wai Leu Giu Pro Lie 635 630 635 640 640 641 Fer Thr Ser Leu Lie Ciy Thr Leu Thr Ang Thr Ser Asp Ser Giu 645 645 650 650 655 Ala Ala Ite Glu His Giu Leu Pro Thr Ala Thr Gin Lys Leu 11e Thr Thr Asn Asp Cys 11e Leu Ser Ser Val Val Ala Leu Thr Asn Cly Ala 465 475 475 Ser Ala Giu Cys Net Leu Gin Tyr Lys Lys Lys Ala Ala Ala Tyr Ket Lys Ser Leu Ang Lys Pro Leu Leu Glu Ser Val Pro Tyr Glu Glu Ala 530 540 Gin Ciu Lys Ciu His Trp Net Leu Giu Aia Gin Leu Aia Lys 11e Lys 580 580 Leu Giu iya Giu Asn Gin Arg Iie Ala Asp iya Leu iya Asn Thr Giy 595 600 Ser Ala Cin Leu Val Gly Leu Ala Cin Ciu Asn Ala Ala Val Ser Asn Val Pro Asp Val Glu Ser Arg Glu Asp Leu IIe Lys Asn His Tyr Net Ala Arg lle Val Glu Leu Thr Ser Cin Leu Gin Leu Ala Asp Ser Lys Lev Ala Giu Lys Ser Lys Giu Ala Lev Thr Giu Giu liet Lys Lev Ala 705 715 Ser Gin Asn Lie Ser Arg Leu Gin Asp Giu Leu Thr Thr Thr Lys Arg 725 730 Ser Val His Phe Tyr Ala Giu Cys Arg Ala Leu Ser Lys Arg Leu Ala 690 700 Asn Giu Thr Leu Ser Lys Gin Arg Giu Giu lie Asp Thr Leu Lys Wet 760 765 Ser Tyr Clu Asp Cln Leu Ser Net Net Ser Asp His Leu Cys Ser Net Ser Ser Lys Cly Asn Ser Lys Lys Asn Lys Ser Arg 770 775 775 ₽

Giu Vai Gin Ile Vai Giu Giu Ala Thr Gin As n Ala Giu Giu Gin Pro 20 30 Wet Leu Lys Ala Ser Ala Aia Ser Pro Ala Val Ala Leu Lys Ala Leu Ser Thr Phe Ser Giu Asn Giu Tyr Asp Ala Ser Trp Ser Pro Ser Trp 35 46 Val Net Trp Leu Gly Leu Pro Ser Thr Leu His Ser Cys His Asp lie 50 60 Val Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Cly Ser Trp Cly Phe Ser 11e Val Cly 65 75 80 Cly Tyr Clu Clu Asn His Thr Asn Cln Pro Phe Phe 11e Lys Thr 11e Val Leu Ciy Thr Pro Ala Tyr Tyr Asp Ciy Arg Leu Lys Cys Ciy Asp 100 Net lie Val Ala Val Asn Gly Leu Ser Thr Val Gly Wet Ser His Ser tys Phe Lys Thr Clu Lys Clu Phe Net Cln Nis Ala Arg Lys Ala Cly SO an Leu Val II.e Pro Pro Ciu Lys Ser Asp Arg Ser II.e III.s Leu Ala Cys 65 Thr Ala Ciy II.e Phe Asp Ala Tyr Val Pro Pro Ciu Ciy Asp Ala Arg Ala Leu Val Pro Met Leu Lys Glu Gln Arg Asn Lys Val Thr Leu Thr Net Ala Ala Pro 11e Pro 61n 61y Phe Ser Cys Leu Ser Arg Phe Leu Gly Trp Trp Phe Arg Gln Pro Val Leu Val Thr Gln Ser Ala Ala 11e Val Pro Val Arg Thr Lys Lys Arg Phe Thr Pro Pro 11e Tyr Cin Pro He Ser Ser Leu Ser Lys Glu Cly Leu He Glu Arg Thr Glu Arg Wet Lys Lys Thr Het Ala Ser Cin Val Ser lie Arg Arg lie Lys Asp Tyr 115 126 Val 11e Cys Trp Pro Gly Ser Leu Val 145 <213> Homo sapiens <213> Homo sapiens <210> 2 <211> 153 <212> PRT <210> 3 <211> 306 <212> PRT <400> 3

[020]

(35)

Asp Ala Asn Phe Lys 11e Lys Asp Phe Proidly Lys Ala Lys Asp 11e

[0200]

特開2001-352986

(33)

Lys Tyr Lys Thr Val Arg Trp Ser Phe Val Glu Ser Leu Glu Pro Ser 180 180 His Val Val Gin Val Arg Cye Ser Ser Wet Wet Asn Gin Giy Asn Val 195 200 206 Phe 11c Ciu Ala H1s Leu Cys Leu Asm Asm Ser Asp H1s Asp Arg Leu 145 150 150 liis Thr Leu Val Thr Glu His Cys Phe Pro Asp Met Thr Trp Asp lle 175 Tyr Cly Cin Lie Thr Val Arg Net His Thr Arg Cin Thr Leu Ala Lie 210 210 Tyr Asp Arg Phe Cly Arg Leu Wet Tyr Cly Cln Clu Asp Val Pro Lys 225 235 230 230 Asp Val Leu Glu Tyr Val Val Phe Glu Lys Cin Leu Thr Asn Pro Tyr 250 255 Gly Ser Trp Arg Wet His Thr Lys lle Val Pro Pro Trp Ala Pro Pro Lys Cin Pro 11e Leu Lys Thr Val Met 11e Pro Cly Pro Cin Leu Lys Pro Clu Glu Glu Tyr Clu Glu Ala Gln Gly Glu Ala Gln Lys Pro Gln 290 300

[0203]

Thr Gly Val Ser Cys Arg Val Cys Lys Val Ala Thr His Arg Lys Cys Lys Ser Leu Asn His Ser Lys Gin Arg Ser Thr Leu Pro Arg Ser Phe Net Lys Pro Arg Lys Ala Clu Pro Kis Ser Phe Arg Clu Lys Val Phe At B Lys Lys Pro Pro Val Cys Ala Val Cys Lys Val Thr 11e Asp Gly Glu Ain Lys Vai Thr Ser Aia Cys Cin Aia Leu Pro Pro Vai Glu Leu Atg Arg Asn Thr Ala Pro Val Arg Arg 11e Glu His Leu Gly Ser Thr Ser Leu Asp Pro Leu Wet Glu Arg Arg Trp Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Val Thr Glu Aig Ile Leu Ala Ala Ala Phe Pro Ala Arg Pro Asp Glu Cin Arg His Arg Cly His Lou Arg Clu Leu Aia His Val Leu Cin Ser lys His Arg Asp Lys Tyr Leu Leu Phe Asn Leu Ser Giu Lys Arg His <213> Homo saptens <211> 261 <212> PRT <210> 4 <400>

3

Leu His Ala Pro Pro Leu Asp Lys Leu Cys Ser ile Cys Lys Ala Net Asp Leu Thr Arg Leu Asn Pro Lys Val Gin Asp Phe Gly Trp Pro Glu

Glu Thr Trp Leu Ser Ala Asp Pro Gln His Val Val Val Leu Tyr Cys Lys Val Gly Gin Asp Leu Gly Phe Pro Gly Ala Trp Arg Phe Gin Val Ser Leu Clu Leu Pro Asp Pro His Pro Cys Leu Ser Val Cys Cln Cly 225 235 230 230 Asn Lys Gly Lys Leu Gly Val 11e Val Ser Ala Tyr Wet His Tyr Ser

Lys 11e Ser Ala Cly

<213> Homo sapiens <211> 615 <212> PRT <210> 5

Net Giu Thr iie Giu Lys Leu Gin Asn Asp Lys Ata Lys Leu Giu Val Lys Ser Gin Thr Leu Giu Lys Giu Aia Lys Giu Cys Arg Leu Arg Thr Clu Glu Cys Gln Leu Gln Leu Lys Thr Leu His Glu Asp Leu Ser Gly <400> 5

Arg Leu Glu Glu Ser Leu Ser ile Ile Asn Glu Lys Vai Pro Phe Asn

Asp Thr Lys Tyr Ser Arg Tyr Asn Ala Leu Asn Val Pro Leu His Asn

Arg Arg His Gin Leu Lys Met Arg Asp lie Aia Gly Gin Aia Leu Aia Phe Val Cln Asp Leu Val Thr Ala Leu Leu Asn Phe His Thr Tyr Thr Clu Cln Arg Ile Cln Ile Phe Pro Val Asp Ser Ala Ile Asp Thr Ile

Thr Giu Asp Thr Val Thr Val Leu Giu Thr Thr Val Lys Leu Lys Thr 165 ... Ser Pro Leu Asn Cln Lys Phe Ser Cln Tyr Leu His Clu Asn Ala Ser Tyr Val Arg Pro Leu Giu Giu Giy Wet Leu His Leu Phe Giu Ser lle 145

Phe Ser Glu His Leu Thr Ser Tyr He Cys Phe Leu Arg Lys He Leu Pro Tyr Gin Leu Lys Ser Leu Giu Giu Cys Giu Ser Ser Leu Cys Thr Ser Ala Leu Ang Ala Ang Asn Leu Giu Leu Ser Gin Asp Net Lys 210 210

[0202]

Leu Ala 305

32)

Pro Leu Leu Glu S er Val Pro Tyr Glu Glu Ala Leu Ala Asn Arg Arg lys Net Thr Ala Val Phe Giu Lys Leu Gin Thr Tyr lle Ala Leu Leu 225 Ain Leu Pro Ser Thr Glu Pro Asp Gly Leu Leu Arg Thr Asn Tyr Ser Ser Val Leu Thr Asn Val Gly Ala Ala Leu His Gly Phe His Asp Val Pro Lys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Ser Pro Leu Ser Ala Glu Cys Wet Leu Gin Tyr Lys Lys Lys Ain Ain Ain Tyr Wet Lys Ser Leu Arg Lys Wet Lys Asp lie Ser Lys His Tyr Ser Cin Lys Ala Ala lie Glu His Glu Leu Pro Thr Ala Thr Cln Lys Leu lle Thr Thr Asn Asp Cys Ile Leu Ser Ser Val Val Ala Ser Thr Asn Cly Ala Gly Lys 11e Ala Ser 305 315 Phe Phe Ser Asn Asn Leu Asp Tyr Phe 11e Ala Ser Leu Ser Tyr Gly 325 336 Trp Net Leu Glu Ala Gln Leu Ala Lys 11e Lys Leu Glu lys Glu Asn Oln Gin Ser Leu Giu Lys He Ser Lys Leu Giu Gin Giu Lys Giu His Cin Arg lie Ala Asp Lys Leu Lys Asn Thr Ciy Ser Ala Gin Leu Val Cly Leu Ala Cin Ciu Asn Ala Aia Vai Ser Asn Thr Ala Cly Cin Asp Ser Arg Glu Asp Leu lle Lys Asn Arg Tyr Het Ala Arg lle Val Glu Arg Leu Gin Asp Giu Leu Thr Thr Lys Arg Ser Tyr Giu Asp Gin Glu Ala Thr Ala Lys Ala Val Leu Glu Pro lle Gln Ser Thr Ser Leu lle Cly Thr Leu Thr Arg Thr Ser Asp Ser Clu Val Pro Asp Val Glu Lew Thr Ser Cin Lew Cin Lew Ala Asp Ser Lys Ser Val His Phe Tyr Ala Glu Cys Arg Ala Leu Ser Lys Arg Leu Ala Leu Ala Glu Lys Ser lys Glu Ala Leu Thr Glu Glu Net Lys Leu Ala Ser Gln Asn 11e Ser Lou Ser Net Wet Ser Asp His Leu Cys Ser Wet Asn Glu Thr Leu Ser Lys Gin Arg Giu Giu lie Asp Thr Leu Lys Net Ser Lys Gly Asn **\$** 265 345 360 Ser Lys Lys Asn Lys Ser Arg 245

<213> Homo sapiens <222> (158) .. (2497) <211> 3168 <221> CDS <212> DNA <210> 6 610 <220> [0204]

aa giggagga ggaggegegege eggeggeege ggeggeget geggig geea ageaggeaga 60 tactgoctga ccepticocg gamegigic tgggittggg ggeggaman aggetgagoc 120 goctgggcgg cctggcctgi acgggggcggg ggaggc atg gcc tcg gct gag ttg 175 Wet Ala Ser Ala Glu Leu

271 319 cag ggg ang tac cag aag ctg gct cag gag tac tcg ang ctt cgg gct Gin Giy Lys Tyr Gin Lys Leu Ala Gin Giu Tyr Ser Lys Leu Arg Ala cag aat cag git cig aaa aag ggt git gig gat gan can gca aat ict Gin Aan Gin Val Leu Lys Lys Ciy Val Val Asp Giu Cin Ala Asn Ser 25 36

223

gca gct tta aag gag caa ctg aaa atg aag gat cag tca ttg aga aaa Ala Ala Leu Lys Glu Gln Leu Lys Wet Lys Asp Gln Ser Leu Arg Lys \$ 9

367

415

cta caa cag gaa atg gac agt ttg aca ttt cga aat ctg cag ctt gcc Leu Gin Cin Giu Met Asp Ser Leu Thr Phe Arg Asn Leu Gin Leu Ala 55 60 70 ang agg gta gan cta ctt can gat gan cta gct cta agt gan cca cga Lys Arg Val Glu Leu Leu Gln Asp Glu Leu Ala Leu Ser Glu Pro Arg

463 21 ggc aug nan anc ang nan agt gga gan tot tot tot cag tig agt can Gly Lys Lys Lys Lys Ser Gly Glu Ser Ser Gln Leu Ser Gln

559 aat gaa cgg ttg cat ata caa ttt ttt gaa gct gat gag cag cac aag Asn Glu Arg Leu His lie Gin Phe Glu Ala Asp Glu Gin His lys 120 130 gng cag aag agt gic itt gat gaa gai cig caa aag.aag ata gaa gag Giu Gin Lys Ser Vai Phe Asp Giu Asp Leu Gin Lys Lys lie Giu Giu 105

655 603 703 cat gig gaa goa gog ctg agg agt cga ctg goc act cig gag aca gaa His Val Clu Ala Clu Leu Arg Ser Arg Leu Ala Thr Leu Clu Thr Clu 135 145 150 140 150 150 150 gaa acc att gag aag cig cag aac gac aag gct aan cta gaa gig amm Giu Thr lle Giu Lys Leu Gin Asn Asp Lys Ala Lys Leu Giu Val Lys gea gec cag cae caa get gtg gtt gae ggt ete aee egg aag tae atg Ala Ala Cin His Cin Ala Val Val Asp Ciy Leu Thr Arg Lys Tyr Wet

tet cag act eta gaa aag gaa gee aag gaa tgt ega ett ega aeg gaa

751

Ξ

Leu Glu Lys Glu Ala Lys Glu Cys Arg		440 445 450
195	700	ctt cca aca gea aca cag aag cig ata aca act aat gac igt atc cig 1567
Glu Cys Glu Leu Glu Leu Lys Thr Leu His Glu Asp Leu Ser Gly Arg	nn.	Leu fro inc Aia inc vin Lys Leu lie inc inc Asn Asp Lys lie Leu 455 460 460 470
200 205 210	;	tes tes gis gig ges tis ses ant ggs ges ggs ang att ges tee tie 1615
and goa tee tta tea ate ate aat goa Clu Clu Ser Leu Ser Ile Ile Asn Clu	847	Ser Ser Val Val Ala Leu Thr Asn Gly Ala Gly Lys 11e Ala Ser Phe 475 485
		tte age aac aat tig gae tae tte att get tea eig age tat gga eet 1663
aca ana tat agt cag tac anc gct ctg aac gtt cca ctc cac aat agg Thr Lys Tyr Ser Gin Tyr Asn Ala Leu Asn Vai Pro Leu His Asn Arg	895	Phe Ser Asn Asn Leu Asp Tyr Phe IIe Ala Ser Leu Ser Tyr Gly Pro 490 500
235 240 245		ang gen geg ngt ggn tte att ngt eet ett ten get gan tge ntg etn 1711
ngn cac cag ctg aag atg cga gat att get ggg cag gee etg get ttt Arg His Gin Leu Lys Wet Arg Asp lie Aia Gly Gin Aia Leu Aia Phe	943	Lys Aia Aia Ser Gly Phe 11e Ser Pro Leu Ser Aia Glu Cys Net Leu 505
250 255 260		tat atg aag tet
Bit cag gat cit gig acg get ett eta aac tit eat ace tae aca gaa	166	Gin Tyr Lys Lys Lys Ala Ala Ala Tyr Wet Lys Ser Leu Arg Lys Pro
val vin Asp Leu val Inr Ala Leu Leu Asn Phe His Ihr Tyr Thr Glu 265 275		530
cag agg att can att ttt cet git gat tet gee att gae act ata tet	1039	Leu Leu Glu Ser Val Pro Tyr Glu Glu Ala Leu Ala Asn Arg Arg Ile
11e Cln 11e Phe Pro Val Asp Ser Ala		
282 280		ctt ctc age tet act gaa agt ega gaa gge ett gea eag eaa git ean 1855
Pro I am Ann Cin I am Dia Can Cin Tam I am U an Cin Ann All Con Tam	1087	Leu Leu Ser Ser Thr Glu Ser Arg Glu Gly Leu Ala Gln Gln Val Gln
the team as the time of the lift Leam is the Ash Ala of lyr		
COC cct ctt one one ofe ctt cat the tet one act at-	186	Cag agt tig gaa aag att tot aan org gag cag gan aan gan cat tgg 1903
Leu Glu Glu Gly Net Leu His Leu Phe Glu Ser		on ser ted old tys lie ser tys ted old oin old tys old nis rip
315 320 325		can ttn gcc aan atc aag ctn gag ana
gag gat act gig act gic tig gag aca act gig aaa tig aan act tit Giu Asp Thr Val Thr Val Leu Giu Thr Thr Val Lya Leu Lya Thr Phe	1183	Net Leu Glu Ata Gin Leu Ata Lys Ite Lys Leu Glu Lys Giu Asn Gin sas, sas
330 335 340		cen att gen gat and etg and ach seet agt gee etg git nag 1999
tea gan ene tte ace tee tae ata tgt ttt ett agg ang att ett eee	1231	Asn Thr Cly Ser Ala Cln Leu Val Cly
Ser Glu His Leu Thr Ser Tyr He Cys Phe Leu Arg Lys He Leu Pro		
OCC.	1370	ctg gcc cag gan ant gct gct gtg ten ant act gct ggc cag gat gan 2047
Tyr Cin Leu Lys Ser Leu Ciu Ciu Ciu Cys Ciu Ser Ser Leu Cys Thr	7.7.7	Leu Ala Lin Liu Asn Ata Ata Val Ser Asn inr Ala Liy Lin Asp Liu 615 620 630
360 365 370		gec aca get aag get gig tig gag eec att cag age ace agi eta att 2095
tel 8'8 ta aga gec agg ant eta gag etg tec cag gae atg asa asa Ser Als Leu Arg Als Arg Asn Leu Clu Leu Ser Cln Asp Net Lys Lys		Ala In' Ala Lys Ala Vai Leu Ulu Pro Ile Uln Ser In' Ser Leu Ile 635
375 380 385 390		aca tot gae agt gag gtt cea gat gtg
and aca get gig itt gag aag etg cag act tac ata get ett ett gec	1375	Arg Thr Ser Asp Ser Glu Val Pro Asp
Net thr Ala Val the Utu Lys Leu Um thr tyr lle Ala Leu Leu Ala		099 659
400 400 400 400 400 400 400 400 400 400	153	egt gaa gae tta att aaa aat eac tac atg gea agg ata gtg gaa ett - 2191 Are Giu Ase Leu He Lys Ase His Tyr Net Ala Are He Val Giu Leu
Glu Pro Asp Cly Leu Leu Arg Thr Asn	!	665 670 675
410 415 420	•	cag ctg get gae agt ang ten gig ent titt int
Big its acts and Bit 886 BCt BCt Cig cat 889 itt cat gac git atg Val Leu Thr Asn Val Cly Aln Ala Leu His Cly Phe His Asp Val Wet	14/1	Inr Ser Un Leu Uin Leu Ala Asp Ser Lys Ser Val His Me Iyr Ala 680 685
425 430 435	į	gag ige cga gea eig tet nan aga eig gee lig get gan ang tet ang 2287
ann gar att icc ann cai tal agi can ann gei gen aid gag eat gan Lys Asp lle Ser Lys His Tyr Ser Gin Lys Ala Ain lle Giu His Giu	6161	the tys Arg Aia Leu Ser Lys Arg Leu Aia Leu Aia thu Lys Ser Lys 695 700 700 710

	•	

2335 2383 2431 gan gca tig aca gan gan atg ann eit gec agt cag aac ate age aga Giu Ala Leu Thr Giu Giu Met Lys Leu Ala Ser Gin Asn lie Ser Arg 715 720 720 ctt cag gat gag ctg aca act acc aag agg agt tac gag gat cag tta Leu Gin Asp Giu Leu Thr Thr Lys Arg Ser Tyr Giu Asp Gin Leu agt atg atg agg gac cac ctg tgc agc atg aat gag aca tta tct aaa Ser Wet Wet Ser Asp His Lau Cys Ser Wet Asn Giu Thr Leu Ser Lys 735 730

2479 2527 cng aga gaa gag att gac aca cta aag atg tcc agt aag ggg aat tct Gin Arg Ciu Giu lie Asp Thr Leu Lys Wet Ser Ser Lys Gly Asn Ser 760 770 755

aaaiggaaaa caatacgtat gicaiggata tigiaggiti ccitaigcig tititacigi 1897 gcacititin aaattaggit tiaaliticag taigiaagaa caaatatiti gtatacitic 2827 tgoantailt aanacatait tgianccagt gaggcanata cagangtiga igicggcagt 2707 ctitecagae cigetecige igeacagage egeagggeig agaceaegte eatgeigget 258? gecttcagga agctnaagta tigtiggace tagtaaacta gtcagigtig gaaneggeet 2647 anacteaatt atatggtaat egattiggta tetatggaat agatatatgt ttetggaaaa 2887 anaigetina niigicanae igicatinei tetinitain giigaaggen tieteengat 2947 cicicitett teicteigag ggagaggag ecctecaaac tteagateet gigggittag 3067 latcattate ticagetett igataeeetg igitagagia atagetaaag gangiteaig 3127 ann ang nac ang ngt cga tagtitigan atagciggit ggegnetgit Lys Lys Asn Lys Ser Arg 775

<213> Homo sapiens <222> (49) .. (507) <211> 1740 <212> DNA <221> CDS < 210> 7 <400> 7 atcaacggca itgatiigac caatitaagi cacagigngg cagitgca aig cig naa Net Leu Lys gcc agt gcc gcg tcc cct gct gtt gcc ctt aaa gca ctt gng gtc cag Ala Ser Ala Ala Ser Pro Ala Val Ala Leu Lys Ala Leu Glu Val Gln

105

23 201 249 att git gag gag gag act cag aac geg gag gag cag ceg agt act tte lle Val Giu Giu Ala Thr Gin Asn Ala Giu Giu Gin Pro Ser Thr Phe 20 35 35 Baa nat Bag tat gat gcc ogt tgg tcc cca tca 198 gtc atg tgg Glu Aan Glu Tyr Asp Ala Ser Trp Ser Pro Ser Trp Val Wet Trp Ser.

237 345 \$ 88 537 net ect get tat tat gat gga aga tta ang tgt gg as ang att gtg Thr Pro Ala Tyr Tyr Asp Cly Arg Leu Lys Cys Cly Asp Wet Ile Val 100 105 115 gec gta aat ggg etg tea acc gtg gge atg age cae tet gea eta git Ala Val Asn Gly Leu Ser Thr Val Gly Wet Ser His Ser Ala Leu Val 120 125 130 Leu Gly Leu Pro Ser Thr Leu His Ser Cys His Asp 11e Val Leu Arg gag and cad add dag cot tit tic att ann act att gic tig gga Glu Asn His Thr Asn Gln Pro Phe Phe lie Lys Thr lie Val Leu Gly ccc atg ttg aag gag cag agg aac aan gtc act ctg acc gtt att tgt Pro Wet Leu Lys Giu Gin Arg Asn Lys Val Thr Leu Thr Val lie Cys tgg cct ggc agc ctt gta t agattttgg aaattggttt caaatcttgc Irp Pro Cly Ser Leu Val 8

aaattitegt gataactgit ceceattiit titigaacet agteteeage etgggigaeg 1017 gagcaagacc ctglcicaaa aaanaaaaaa aaaaagacti gigcititca tataacatgg 1077 ccccaaagc ccaccagcaa cicigitgii gcitaacaga ggaagacagi cigitciaan 1137 getygtagaa aagetygeea gttygaeeee tyagaaacaa tatytetyty teetytytt 1197 gectaectes gagattites agggesatti tgaasatgig taattitige tatiggagit 1257 aactataiga tittcagcag cgicaccata cctagcigat cicitccigc citcatcicc 1317 agtactgatt taatcatctt aattititat tittgaaaag atgiteetit tacatgitit 1377 aigiaigigi cigictataa giaicaacai icagigaana gicicagita igccceagii 1437 tigitititig iticactett ccaaacaggi aaccactiti gitacigata igicalieca 1497 gagtitetet acteaaatat tiaaaaagae aaattietit tiittaaaaa titetieett 1557 gitteteate iganaagiag catactaaca cacagetitt aasaacitta taettiigit 1617 ttitigitti tititaagac gegittigge teigitteee aggitgeagt gagagagat 1677 egigecactg cactelagee tiggigacag ageaagacte igigicaaaa aaaaaaaaa 1737 aaa 1740 natgngcnan geteaecean netgtgeece agatggagta nagacettet ggtgggtett 937 igitttengt naetgnaten tagnnegagt tetgtatece tenggeetgn igtengenan 997 gecagtanca acagegigta eigecacigi catanecani accaiganig aniniaetti 957 atetteettt tttagatttt tgaaagaaaa eeetttggit teattgigit igtggittag 597 gagetgetga caetgetggt atacacaggg ceasascees etasgattgt eegtttatgt 657 ttatttaaat ggtttcctaa gttagttaca tttcttttag ctiggaaaca gtcttccact 717 ascettigig agittatait ticagaatic agacitagit gitaasatgi tacciatggi 777

[0206]

<211> 1574

<212> DNA <213> Homo sapiens

<221> CDS

ggg ett eec age aca ett eat age ige eac gat ata git ita ega

[0205]

castasatt catacttata tcacasana assassasa a

cigggigaig aggetgetgg angettigna gietecenii ecectenige intannaga 1029 gag gcc cag aag cct cag cta gcc tgatgacaaa aatgacttct agggggaagc Glu Ala Gln Lys Pro Gln Leu Ala 300 ans cag tig aca aac ccc tat gga agc tigg aga atg cat acc aag atc git Cin Leu Thr Asn Pro Tyr Ciy Ser Trp Arg Wet His Thr Lys lie Val 255 260 260 ccc cca tgg gca ccc cct aag cag ccc atc ctt aag acg gtg atg atc Pro Pro Trp Ala Pro Pro Lys Cin Pro 11e Leu Lys Thr Val Wet 11e 8gc git tog tgc aga gtc tgc aag gtg gcg acg cac aga aaa tgc gaa Gly Val Ser Cys Ag Val Cys Lys Val Ala Thr His Arg Lys Cys Glu 35 40 45 60 8ca aag gtg act tca gcc tgt cag gcc ttg ccc gcg gag ttg cgg gag ttg cgg so The Lys Val Thr Ser Ala Cys Gln Ala Leu Pro Pro Val Glu Leu Arg So 65 65 Val Phe Glu Lys agiccicagg cccigggaca gcigcigagg aaggagaga gacccagggag agcc aig Gin Giu Asp Val Pro Lys Asp Val Leu Giu Tyr Val 235 240 245 2 290 <213> Homo sapiens <222> (55) .. (837) 270 20 <211> 1368 <212> DNA <221> CDS <400> <210> 9 <220> [0207] 627 7 195 243 291 339 387 435 483 579 5 66 23 675 723 77 cag gan gat gin ccc ang gat gic cig gag tat git gin tic gan ang

Ē

特開2001-352986

<222> (22) .. (939) <400> 8 BBCBBccttt BCBBBaacaa g atg gca gcc ccc ata cct caa ggg ttc tct Met Ala Ala Pro lle Pro Gln Gly Phe Ser

tgt tta teg agg tit tig gge tgg tgg tit egg cag eca git eig gig Cys Leu Ser Arg Phe Leu Gly Trp Trp Phe Arg Cln Pro Val Leu Val

act cag tee gea get ata get eea gia aga act aan aaa egt ite aea Thr Gin Ser Ala Ala lle Val Pro Val Arg Thr Lys Lys Arg Phe Thr

cct cct att tat caa cct aaa ttt aaa aca gaa aag gag ttt atg caa Pro Pro lie Tyr Gin Pro Lys Phe Lys Thr Giu Lys Giu Phe Met Gin

cat gcc cgg aan gca gga ttg gtt att cct cca gan aan teg gac egt His Ata Arg Lys Ata Gly Leu Val Ile Pro Pro Glu Lys Ser Asp Arg

tcc ata cat cig gcc tgt aca gct ggt ata ttt gat gcc tat gtt cct Ser lie His Leu Ala Cys Thr Ala Gly lie Phe Asp Ala Tyr Val Pro 75

5 90

ang aga act gaa cga atg aag aag act atg gca tca caa gtg tca atc Clu Arg Thr Clu Arg Wet Lys Lys Thr Wet Ala Ser Cln Val Ser Ile 2 9

cgg agg ata man gnc tat gat gcc anc ttt ann ata mag gac ttc cct Arg Arg lle Lys Asp Tyr Asp Ala Asn Phe Lys lle Lys Asp Phe Pro 130

gga aaa gct aag gat atc tit att gaa gct cac cit tgt cta aat aac Gly Lys Ala Lys Asp lle Phe lle Glu Ala His Leu Cys Leu Asn Asn

tca gac cat gac cga ctt cat acc ttg gta act gac cac tgt ttt cca Ser Asp His Asp Arg Leu His Thr Leu Val Thr Glu His Cys Phe Pro 155 160 160 170 gac atg act tgg gac atc asa tat asg acc gtc cgc tgg agc ttt gtg Asp Met Thr Trp Asp lie Lys Tyr Lys Thr Val Arg Trp Ser Phe Val

gon tot tta gag occ tot cat git git can git ego igi toa ag i aig Giu Ser Leu Giu Pro Ser His Val Val Gin Val Arg Cys Ser Ser Wet

ggc cag atc acc gta cgc atg cac Gly Gln Ile Thr Val Arg Ket His atg and dag gge and gtg tad gge Net Asa Cla Cly Asa Val Tyr Cly

ggc cgg ttg atg tat Gly Arg Leu Het Tyr Ħ 돈 cag act ctg gcc atc tat gac cgg Gin Thr Leu Ala IIe Tyr Asp Arg 220 225 8 ¥

819

cet gge cet cag etg aaa eea gaa gaa gaa tat gaa gag gea caa gga Pro Cly Pro Gin Leu Lys Pro Giu Giu Giu Tyr Giu Giu Ala Gin Giy

915

867

696

accacagg caggarcag aguigant gnavigiti caggigitig gananatiti 1229 ggigagitic gracatitic crigiticag gregogacig gacogcott cagniggicag 1389 nagiggaaga tgagcitat grigagigit ggacitian gganatgagg actggoggang 1449 antanitagi gittataaga cattiaagag gcccittitic ataiacigac tcacigatga 1509 atcagcatit gcattitatg gananatata antgcaanga antanitian ananananan 1569 annan atgactgatg actgggccct agcaggtggc aggtataaca tggccatgga cactettett 1149 ttttaaattt tatgictagc tictgagict agaigaaaga cagtaigitt cagagaacai 1209 iggatatesg titticceae ageagggaci gigagagaea aceageagea tectetiigi 1269 actacctity tictetecea tectycteny gietititeny engietenie atenyennee 1089

153 ang oct agg ann got gag oct cat ago tto ogg gng nag git tto ogg Lys Pro Arg Lys Ala Glu Pro His Ser Phe Arg Glu Lys Val Phe Arg

105

23

2 ang ana cet eca gie igi gen gia igi ang gig ace ate gai ggg aca Lys Lys Pro Pro Vai Cys Ala Vai Cys Lys Vai Thr He Asp Giy Thr

249

2

270

318

366

₹

462

910

558

ttg aat cag Leu Asn Cln

520

98

654

8t8 Val

702

165

750

tac sta igt tit cit agg ang att cit coc tat ogg its ass Tyr lle Cys Phe Leu Aig Lys lle Leu Pro Tyr Gln Leu Lys

Ser

特開2001-352986

8

2

170

165

[0208]

特開2001-352986

(42)

06	Asn Ala Ala Val Ser Asn Thr Ala Gly Glu Asp Glu Ala Thr Ala Lys 455 8ct ggt tg gag ccc att cag age acc agt cta att ggg act tta acc 1614	And was been upon the bull set into set been the bully into lead into 480 485 480 485 agg aca tot gac agt gag gat coa gat gig gaa tot ogt gaa gac tta 1662 Ang Thr Ser Asp Ser Giu Vai Pro Asp Vai Giu Ser Ang Giu Asp Leu	490 att aan aat ege tac atg gea agg ata gig gaa ett aeg tet eag tig 1710 lie Lys Asn Arg Tyr Net Ala Arg lie Vai Giu Leu Thr Ser Cin Leu 505 510 cag et get gae agt aag tea gig eat tit tat gee gag ge ega gea 1758	Gin Leu Ala Asp Ser Lys Ser Val His Phe Tyr Ala Giu Cys Arg Ala 520 520 ctg tet aan aga etg gee ttg get gan aag tet aag gan gen itg aca 1806 Leu Ser Lys Arg Leu Ala Leu Ala Giu Lys Ser Lys Giu Ala Leu Thr 535 545 540	gan agan atg and ctt god agt dag and atd agd aga tgag gat gag 1854 Glu Glu Net Lya Leu Ala Ser Gln Asn lle Ser Arg Leu Gln Asp Glu 550 555 555 ctg acd act act ang aga gat tac gag gat tag aga agt ang agg agt leu Thr Thr Lya Arg Ser Tya Cln Ash Gln Leu Ser Net Ser	Soo Ser Met Ann Ciu Thr. Leu Ser Lys Cin Arg Ciu Ciu Asp His Leu Cys Ser Met Ann Ciu Thr. Leu Ser Lys Cin Arg Ciu Ciu S860 580 580 580	att gac aca cta aag atg tee agt aag gag aat tet aaa aag aac aag 1998 IIe Aap Thr Leu Lys Wet Ser Ser Lys Cly Asn Ser Lys Asn Lys 600 805 805 810 827 828 828 828 818	tigracagage egeaggetg agacaegte catgetgget gettteagga agetaaagta 2114 tigrtggace tagtaaacta gteaglgtig gaaacggeet tgaaatatti aaaacatatt 2174 tgtaacegt agacaata eagagtiga tgteggeagt aaatgaaaa canteqtat 2334 gteatggata tiglaggitt ecitatgetg tittiacigt geattitia aaataggit 2294 ttaattotag tagtaagaa canatatti gtatactite aaacteatt ataggtaat 2354	cgattiggta tctatggaat agatatgigt ttctggaaaa aaaaaaaaa aaaa 2408 [0 2 0 9]	<211> 30 <212> RWA <213- Artificial Sequence <220>	<223> an artificially synthesized oligo-cap linker sequence <400> 11 agraucgagu cggccuuguu ggccuncugg 50 (0 2 1 0)
. 69	185 190 195 agt tta gaa gaa tgt gaa tee tet tge aea tet geg tta aga 798 Ser Leu Giu Giu Cys Giu Ser Ser Leu Cys Thr Ser Ala Leu Arg 200 206	488 ant cta gag ctg tec eng gae atg ana ana atg aca get gtg Ang Asn Leu Glu Leu Ser Gln Asp Wet Lys Lys Wet Thr Ala Val 215 225	ctt gec tig eea Leu Ala Leu Pro 240 agt tet gtg tta Ser Ser Val Leu	BIT BST ECT ECT OF A SECTION AND SECTION A	Lys His Tyr Ser Cin Lys Ala Ala Lie Ciu His Giu Leu Pro Thr Ala 280 280 280 aca cag aag cig ata aca act aat gac tgc acc cig tea tea gta gtg 1086 Thr Cin Lys Leu He Thr Asn Asp Cys I te Leu Ser Ser Val Val 285 300 300	Sco too aca aat gga gca gga aag att gca toc tto tto ago aac aat 1134 Ala Ser Thr Asn Gly Ala Gly Lys Ile Ala Ser Phe Phe Ser Asn Asn 310 320 315 ttg gao tac tto att gct toa ctg ago tat gga oot aag gca gcg agt 1182	Leu Asp Tyr Phe IIe Ala Ser Leu Ser Tyr Gly Pro Lys Ala Ala Ser 330 335 340 880 ttc att agt cet tte aget gaa tge at get ac cag tat ang ana 1230 Gly Phe IIe Ser Pro Leu Ser Ala Glu Cys Met Leu Gln Tyr Lys Lys 345 350 355 ana get get get atg ang tet ttg aga ang cet et t g ang tet 1278	Lys Ala Ala Ala Tyr Wet Lys Ser Leu Ang Lys Pro Leu Leu Glu Ser 360 370 818 cet tat gaa gaa gea etg gea aac ege ege ate ett ette age tet 1326 Val Pro Tyr Glu Glu Ala Leu Ala Asan Ang Ang Ile Leu Leu Ser Ser 375 389	ggc ctt gca cag caa gtt caa cag agt Gly Leu Ala Gin Gin Val Gin Gin Ser 395 998 cag gaa aaa gaa cat tgg atg ttg Glu Gin Giu Lys Giu His Trp Net Leu	410 410 Can the got and che gog man gan and cele cele and got 1470 Gin Leu Ala Lys Ite Lys Leu Clu Lys Clu Asn Cln Aig Ite Asp 425 430 430	ang citg ang nat nen ggi agi agi ger eng citg git ggg citg gee eng gana 1518 Lys Leu Lys Ann Thr City Ser Ahn Cin Leu Val City Leu Ala Cin Ciu 440 440 445 Ann Ann City Ree eng gee eng gee ach gee ang 1566

	(24)	ショュリット・ランの変数	1877	
		10076		
	5	92	93	Z
	<210> 12		<213> Artificial Sequence	
	<211> 42		<220>	
	<212> DNA		<223> an artificially synthesi zed primer sequence	
	<213> Artificial Sequence		<400> 17	
	<2.2.0>		catttactgc cgacatcaac t	21
	<223> an artificially synthesized oligo(dT)primer sequence	[0216]		
	<400> 12		<210> 18	
	geggetgaag aeggeetatg tggeettttt tttttttt tt	42	<211> 21	
[0211]			<212> DNA	
	<210> 13		<213> Artificial Sequence	
•	<211> 21		<220>	
	<21.2> DNA		<223> an artificially synthesized primer sequence	
	<213> Artificial Sequence		<400> 18	
	<220>		gcgaaaatga gtatgatgcc a	21
	<223> an artificially synthesized primer sequence	[0217]		
	<400> 13		<210> 19	
	agcatcgagt cggccttgtt g	21		
(2 20)			<212> DNA	
	<210> 14		<213> Artificial Sequence	
	<211> 21		<220>	
	<212> DNA		<223> an artificially synthesized primer sequence	
	<213> Artificial Sequence		<400> 19	
	<220>		getectanne cacanacaen nt	22
	<223> an artificially synthesized primer sequence	[0218]		
	<400> 14		<210> 20	
	gaggatgang naggaatatg t	21	<211> 21	
			<212> DNA	
[0213]			<213> Artificial Sequence	
	<210> 15		<2220>	
	<211> 10		<223> an artificially synthesized primer sequence	
	<212> DNA		<400> 20	
	<213> Artificial Sequence		acgaatgaag aagactatgg c	21
	<220>	[0219]		
	<223> an artificially synthesized NF-kappaB-binding-site sequence		<210> 21	
	<400> 15		<211> 20	
	gggaanttcc	01	<212> DNA	
[0214]			<213> Artificial Sequence	
	<210> 16		<022>	
	<111> 22		<223> an artificially synt hesized primer se quence	
	<21.2> DNA		<400> 21	
	<213> Artificial Sequence		agggatcatc accgtetta	20
	<250>	[0550]		
	<223> an artificially synthesized pri mer sequence		<210> 22	
	<400> 16		<211> 20	
	antenetaen tggeanggat ng	22	<212> DWA	
103161			<213> Artificial Sequence	
re 701	11 014		<027>	
	11 <2112		<22.55 an artificially synthesized primer sequence	
	13 5115 51 2012- ANA		27 <0.04>	Ş
	VVA <212>		כנכשוכככום וכוכוכופוכ	ny

[882]

特開2001-352986 (49)

<210> 23

[0221]

<211> 20 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<022>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 23

gttcaagcaa tteteetgee

【符号の説明】

【図1】は、PCR法を用いて、35個のヒト組織(職別)におけるCOL03279転写物の発現量を開いた 【図面の阿単な説明】

【図2】は、PCR法を用いて、35種のヒト組織(観報)におけるCOL06772転写物の発現量を関へた 結果である。

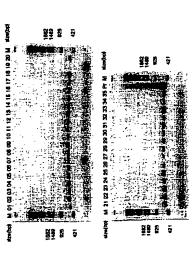
結果である。

【図3】は、PCR法を用いて、35億のヒト組織(職

器) におけるADKA01604転写物の発現量を開べ 【図4】は、PCR法を用いて、35個のヒト組織(職制)におけるADSU00701配写物の発現量を調べ

01:10時、02:16、03:16以核、04:14月、0 路下垂体、10:小脚、11:骨柱、12:扁桃体、3:小脳、14:脳梁、15:胎児監、16:胎児 體、17:胎児肝臓、18:胎児肺、19:心臓、2 全図中に記載の数字、英字は以下の通りである。

[| |



[83]

83 g 4

35 8 g

(ESA) (ESA) (ESA)			- 0 2 8 8 5 0 -	C 1 2 Q 1/68 C O 1 N 33/15 33/50 33/56 C 1 2 P 21/08 (C 1 2 N 1/21 C 1 2 R 1:19)	▼ D D S S >
		// C 2 P 21/08 (C 2 N 1/21 C 2 R 1:19) (C 2 N 5/10 C 2 R 1:91)	m - 60 0 G	1:91) C 1 2 N 15/00 A 6 1 K 37/02 C 1 2 N 5/00 C 1 2 R 1:91)	2 N A A
		(12)祝园中中村、拓彝村田、田、田、田、田、田、田、田、田、田、田、田、田、田、田、田、田、田、田、	中立 右艦 神後三昧 銀囚 もどみ 野ー 17-33 神後三昧 銀囚 もどう アー 17-33 智野 二大 東京部が世 四部交換 4-8-13	F ターム(体生) 28030 20045 48024	28030 AB03 AD05 CA06 CA17 CA19 2C045 AA34 AA35 BE20 CB01 CB02 CB17 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03 GB034 AA01 AA11 BA80 CA04 CA05 CA20 DA03 EA04 FA02 FA06 CA20 DA03 EA04 CA05 CA20 DA03 CA14 CA18 HA11 4B063 QA01 QA13 QA17 QA19 QQ43
(株別配子) Fi A 6.1 K 48/00 A 6.1 P 3/10 A 6.1 P 3/10 9/04 9/10 11/00 11/04 11/04	デー72-ド (彼年) 4 B O G S 4 C O B 4 4 C O B S · 4 H O 4 S			48064	48064 ACO1 AG28 AG27 CAO2 CAIO CAII CAI9 CA20 CCOI CC24 DAOI DAI3 48065 AA26X AA93Y ABOI ACI4 AGI6 BA03 BA05 BA25 6801 BC03 BC07 BA25 CAA4 CA46
11/06 13/12 13/12 19/02 19/06 19/10 31/00 31/12				7 800 7	CA44 CA46 CO084 AA01 AA13 AA16 CA23 CA49 NA14 ZA361 ZA36 ZA451 ZA452 ZA891 ZA592 ZA451 ZA752 ZA891 ZA892 ZA971 ZA97 ZB191 ZB192 ZB191 ZB152 ZB861 ZB262 ZB331 ZB332 ZB261 ZB352 ZB351 ZB332 ZB351 ZB352 ZB351

レロントムーンの概念

特閒2001-352986

																•									
チーコーナ (参考)	48065	4 C 0 8 4	4 C 0 8 5	4H045					4												101				U
ts.	A 6 I K 48/00		6 /04	01/6	11/00	20/11	11/04	11/06	13/12	11/06	19/02	90/61	01/61	31/00	31/12	31/18	35/00	35/02	37/04	37/08	43/00	C 0 7 K 14/47		C 1 2 N 1/21	C I 2 P 21/02
建 图記事																							101		
(51) Int.Cl.	A 6 I K 39/395			A 6 I P 3/10	9/04	9/10	00/11	11/02	11/04	90/11	13/12	11/06	19/02	19/00	19/10	31/00	31/12	31/18	35/00	35/02	37/04	37/08	43/00	C 0 7 K 14/47	81/91

4C085 AA11 DD62 4E045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50 FA71 FA74

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☑ BLACK BORDERS
☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
☐ FADED TEXT OR DRAWING
☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
\square COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
Потнер.

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.